



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

藥學博士 學位論文

성선자극호르몬분비호르몬수용체(GnRHR)  
신규 리간드(GV1001)의 항전립선암 작용

**Anti-prostate cancer effect of GV1001, a novel  
GnRHR ligand**

2019년 2월

서울대학교 대학원  
약학과 약물학 전공

김 지 원

## 성선자극호르몬분비호르몬수용체(GnRHR) 신규 리간드(GV1001)의 항전립선암 작용

### Anti-prostate cancer effect of GV1001, a novel GnRHR ligand

김 지 원

지도교수: 강 건 욱

항암 백신인 GV1001은 인간 텔로머라아제 역전사효소 촉매 소단위(hTERT)의 일부 16개 아미노산으로 구성된 펩타이드로 인체 면역계 중 암세포 선택적인 T세포 기능을 강화시키는 cancer vaccine이다. 최근 다양한 암종에 대해 GV1001이 항암 효능을 갖는다는 연구와 임상 결과가 보고되어 있지만, 아직까지 항암제로써 그 기능과 기전에 대한 연구는 부족하다.

전립선암은 남성에서 가장 많이 발병하는 암종이며, 암에 의한 사망의 주된 원인이다. 전립선암 치료 요법으로는 호르몬 요법, 전립선적제술, 방사선 치료 및 항암화학요법이 사용되는데 특히 호르몬 요법이 단독 혹은 병용으로 다른 치료 요법과 함께 사용된다.

전립선암의 치료가 어려운 이유는 항암제 저항성 전립선암으로 쉽게 악성화되기 때문인데, 악성화가 일어나면 빈번한 재발과 빠른 전이로 인하여 사망률이 크게 높아진다. 현재까지 이러한 전이성 전립선암에 대한 진단 마커와 치료 전략이 부족한 실정이다.

본 연구에서는 GV1001을 GnRH 수용체에 작용하는 새로운 리간드로 제시하고, 악성 전립선암에 적용 가능한 새로운 치료 약제로 규명하고자 하였다. 첫 번째, GV1001을 최초로 GnRH 수용체 리간드로서 제시하고 그 기능에 대한 연구를 진행하였다. 두 번째, 전립선암의 악성화 형태인 암세포 전이에 대한 GV1001의 기능과 기전 탐구를 통한 전립선암 치료 요법 발굴을 연구 목표로 설정하였다.

GV1001의 구조 분석 결과, 펩타이드 서열 일부가 GnRH 유사체들과 중첩되는 것을 확인하였다. 이 서열은 GnRH 유사체가 수용체와 결합하는 데에 핵심적인 역할을 담당하고 있을 것으로 예측되어 GV1001이 GnRH 수용체와 결합하는지 확인하였고, 결과적으로 GnRH 수용체와 결합하여 하위 신호 전달을 매개하고 있음을 관찰하였다. 또한, 대표적인 GnRH 유사체인 leuprolide acetate(LA)와 비교하였을 때, LA 처치에 의하여 GnRH 수용체 주요 하위 전달 신호인  $G_{\alpha q}$ -칼슘 분비가 증가한 반면 GV1001 처치에 의하여 부차적인 하위 전달 신호인  $G_{\alpha s}$ -cAMP 신호가 활성화 되는 것을 관찰할 수 있었다. LA와 GV1001는 또한 경쟁적으로 상호 신호 전달을 억제하였으며, 이러한 신호 전달은 GnRH 수용체에 의존적으로 관찰되었다.

GV1001의 GnRH 수용체 매개 전립선암 억제 효과를 평가하기 위해 동물 실험과 세포 실험을 진행하였다. GV1001을 반복하여 투여했을 때,

누드 마우스의 혈중 테스토스테론 수치가 현저히 감소하였으며, 정액 소포 무게가 유의하게 감소하였다. 또한, GV1001 처치에 의해 전립선암 이종 이식 누드 마우스 모델에서 LNCaP 세포주 종양의 부피가 감소하였으며 종양 내 세포자가사멸 마커의 유도과 세포증식 마커의 억제와 관찰되었다. 암세포 전이 유도 인자인 MMP2, MMP9의 종양 내 mRNA 발현 수준을 평가한 결과 GV1001 처치에 의해 MMP2, MMP9의 mRNA 발현 수준이 억제되는 것을 확인하였다. 세포 실험에서 GV1001 처치에 의해 LNCaP과 PC-3 세포주 증식이 감소되었으며, Transwell-세포 이동능 평가 결과에서도 LNCaP과 PC-3-세포주 이동능이 감소하였다. 또한, LNCaP과 PC-3 세포주 내의 세포자가사멸 유도 효과가 관찰되었다. GV1001의 세포자가사멸 유도 효과는 GnRH 수용체에 의존적으로 관찰되었다. 이러한 GV1001의 암세포 발현-GnRH 수용체에 대한 직접적인 암세포 억제 효과가 생체 내에서 관찰되는지 평가하기 위해 CRISPR/Cas9 유전자 편집 시스템을 도입한 LNCaP 전립선암 세포주를 구축하여 이종 이식 누드 마우스 모델을 구축하였다. 그 결과, GV1001 처치에도 GnRH 수용체 편집 LNCaP 세포주 종양의 부피가 유의하게 감소하지 않았다. 이러한 결과는 GV1001의 전립선 종양 억제 효과가 뇌하수체 호르몬 분비 세포 및 암세포 자체에 발현된 GnRH 수용체 모두를 경유하여 나타나는 효과임을 시사한다.

전립선암 이종 이식 누드 마우스 모델에서 GV1001은 종양 내 MMP2, MMP9의 mRNA 발현 수준을 억제하였으며, LNCaP, PC-3 세포주의 이동능을 감소시킨 바 있다. 이러한 세포 이동능 및 전이에 미치는 GV1001의 영향에 대해 탐구하기 위해 세포 표현형 변화를 관찰하였다.

GV1001의 처치는 LNCaP 세포의 상피간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT)을 억제하였다. 또한, ultra-low attachment surface plate 에서 배양된 LNCaP 세포의 구 형성능이 GV1001 처치에 의해 억제되는 것을 관찰하였다. 전립선암 세포의 세포 표현형 및 이동능에 미치는 GV1001의 영향이 결과적으로 생체 내에서 다른 장기로의 전이를 억제할 수 있는지 비장-간 전이 마우스 병리 모델(spleen-liver metastasis)을 통해 평가하였다. 비장에 LNCaP 세포를 주입한 후 GV1001을 처치하였을 때, 간 전이 발생 빈도와 종양 면적이 모두 감소되는 것을 확인하였다.

안드로겐 결핍이나 AR 활성 저해는 전립선암의 항-안드로겐 약제에 대한 저항성의 원인이 되고 다양한 발암원성 신호전달을 촉진하는 것으로 알려져있다. GV1001의 전립선암 억제, 특히 이동능의 억제에 AR 활성이 영향을 미치는지 평가하였고, AR의 Gas-cAMP 신호 의존적 활성화가 관찰되었다. GV1001의 처치에 의해 LNCaP-세포주 내 AR의 인산화와 androgen-response element(ARE) 매개 전사활성이 증가하는 것을 western blot assay와 luciferase assay를 통해 관찰하였다. 이러한 AR 활성화 및 AR 발현 증가는 LNCaP 세포주의 세포 이동능을 억제했다. AR 활성은 일반적으로 전립선암의 증식을 매개하는 주요 인자로 알려져 있으나, 전이 억제를 유도하는 기전을 탐구하기 위해 AR과 결합하는 보조활성자의 역할을 규명하고자 하였다.

AR 결합 보조활성자와 GnRH 수용체 하위 전달 신호 중 Gas-cAMP 신호 특이적 활성화의 연관성을 평가하기 위해 전립선암 환자의 전이와 관련된 유전자 발현을 분석하였고 핵심 유전자로 YAP1을 도출하였다. 세포 실험을 통해 GV1001 처치에 의한 YAP1의 인산화, 세포질 내 축적

및 유비퀴틴화-단백분해효소 활성화를 관찰하였다. YAP1의 분해에 따라 AR과의 결합이 저해되고 YAP1 의존적 타겟 유전자의 발현이 억제되었다. 또한, YAP1 타겟 유전자의 프로모터 부위에 대한 AR의 결합능 역시 억제되는 것이 관찰되었다. 이러한 YAP1의 활성 억제 효과는 GV1001의 Gas-cAMP 신호 의존적으로 관찰되었다. 세포 전이 실험을 통해 GV1001의 Gas-cAMP 신호 의존적 YAP1 활성 억제가 세포 전이를 억제하고 있음을 확인하였다. 전립선암 세포의 성장과 전이에 미치는 YAP1의 역할을 평가하기 위해 CRISPR/Cas9 유전자 편집 시스템을 도입한 YAP1 편집 LNCaP 세포주를 구축하였다. YAP1 편집 LNCaP 세포주는 세포의 이동능이 대조군 LNCaP 세포주에 비하여 현저하게 억제되어 있었으며, 누드 마우스 모델에서 종양의 성장이 대조군 LNCaP 세포주 종양에 비하여 유의하게 느린 것을 관찰하였다. 또한, YAP1 편집 LNCaP 세포주에서 GV1001에 의한 세포 이동능 억제 효과는 관찰되지 않았다. 활성화된 YAP1은 핵 내에 존재하여 다양한 발암원성 유전자들의 전사를 촉진하는 전사 인자로 작용한다. 활성화 YAP1의 발현을 촉진(constitutive active)하는 형태인 YAP5SA를 과발현시킨 후 YAP1의 과활성이 미치는 영향을 평가하고자 하였다. YAP1 편집 LNCaP 세포주와 반대로 YAP5SA 발현 LNCaP 세포주는 대조군 LNCaP 세포주에 비하여 세포의 이동능이 현저하게 증가되어 있었다. 그러나, YAP1 편집 LNCaP 세포주와 마찬가지로, GV1001에 의한 세포 이동능 억제 효과는 YAP5SA 발현 LNCaP 세포주에서도 관찰되지 않았다.

종합하여 볼 때, 본 연구에서 규명한 GV1001의 GnRH 수용체 리간드로써의 역할은 Gas-cAMP 신호의 선택적 활성화이며 Gas-cAMP

신호 전달을 통해 YAP1의 활성 억제와 AR의 활성화가 유도되는 것을 확인하였다. AR-YAP1 결합은 AR 활성화에 따른 전이 촉진의 주요한 인자이고, 이를 저해했을 때 전이 억제 효과가 관찰된다. 따라서 전립선암의 악성화를 제어하는 새로운 타겟으로 YAP1을 제시하며, 이를 활용하면 기존 호르몬 치료제의 저항성 매개 기전을 이해하고 전립선암의 새로운 치료 방안을 도출할 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 전립선암, hTERT, GnRH 수용체, 안드로겐 수용체, YAP1

학번: 2012-21577



# 목 차

국문요약 .....	i
목차.....	vii
List of figures .....	ix
List of abbreviations .....	x
 I. 서론 .....	 1
 II. 연구재료 및 방법.....	 9
시약 및 재료 .....	9
세포 배양 .....	9
리간드-수용체 결합능 평가.....	10
스트렙타아비딘-비오틴 결합능 평가 (Streptavidin-Biotin binding assay).....	10
FITC-표지 GV1001 을 이용한 세포 내 위치 평가 .....	11
세포 내 칼슘 정량 .....	11
리포터 유전자 분석 (Reporter gene assay) .....	12
면역화학적 분석 (Immunoblot analysis) .....	12
cDNA 의 Realtime RT-PCR .....	13
형질도입 (Transfection).....	14
세포 증식 분석법.....	15
염색질면역침전법 (Chromatin immunoprecipitation assays).....	16
체외 세포의 이동성 분석법 .....	16
면역침강법 (Immunoprecipitation) .....	17
Caspase-3/7 활성 평가.....	17
암 성장 마우스 병리 모델 (Xenograft nude mouse model) .....	18
TUNEL 분석법 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay) .....	18

면역조직화학염색 (Immunohistochemistry).....	19
마우스 혈중 테스토스테론 정량.....	19
비장-간 전이 마우스 병리 모델.....	19
통계분석.....	20
<b>III. 연구결과</b> .....	<b>21</b>
1) GV1001의 전립선암 억제 효과 및 타겟 규명 .....	21
1. GV1001과 GnRH 구조 유사체들의 펩타이드 구조 분석 .....	21
2. GV1001에 의한 GnRH 수용체 하위 신호 전달 평가.....	26
3. GV1001에 의한 전립선 종양 억제 효과 .....	30
4. GV1001의 전립선암 세포 증식과 이동능 억제 효과 .....	35
5. GV1001에 의한 세포자가사멸 유도 효과.....	39
2) 전립선암 악성화에 따른 전이 기전 및 치료적 타겟 제시.....	44
1. 전립선암 세포의 상피간엽전환(EMT) 및 전이 억제 효과.....	44
2. 전립선암 세포에서 AR의 세포 이동능 조절 .....	49
3. 전립선암 세포에서 GV1001의 AR 활성화 조절 .....	51
4. GV1001의 AR 활성화 신호 조절.....	54
5. 전립선암에서 AR 보조조절자 YAP1의 활성화 .....	58
6. YAP1 활성화 조절에 의한 세포 이동능 조절 효과.....	63
<b>IV. 고찰</b> .....	<b>68</b>
<b>V. 참고문헌</b> .....	<b>76</b>
<b>VI. Abstract</b> .....	<b>88</b>
<b>VII. Curriculum Vitae</b> .....	<b>91</b>
<b>VIII. 감사의 글</b> .....	<b>94</b>

## List of figures

Figure 1. Binding of GV1001 to GnRHR .....	22
Figure 2. Docking studies of GV1001 to GnRHR.....	24
Figure 3. Selective activation of Gas-cAMP pathway by GV1001 .....	28
Figure 4. <i>In vivo</i> anti-cancer effect of GV1001 .....	32
Figure 5. Effects of GV1001 on cell proliferation and migration in PCa cells.....	36
Figure 6. GnRHR-dependent apoptosis induction by GV1001 .....	41
Figure 7. Effects of GV1001 on PCa-tumor metastasis.....	46
Figure 8. Regulation of AR in PCa migration model <i>in vitro</i> .....	50
Figure 9. Activation of AR by GV1001 in PCa cells .....	52
Figure 10. Gas-cAMP pathway-dependent activation of AR by GV1001 .....	56
Figure 11. Inactivation of YAP1 and AR-coregulator switch by GV1001 .....	60
Figure 12. Effects of YAP1 regulation on PCa <i>in vitro</i> migration and <i>in vivo</i> progression.....	65

## **List of abbreviations**

ADT: androgen deprivation therapy

AR: androgen receptor

ARBS: androgen receptor binding site

ARE: androgen-response element

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

CA: cetorelix acetate

ChIP: chromatin immunoprecipitation

CRE: cAMP response element

CRPC: castration-resistant prostate cancer

DAPI: 4'6-diamidino-2-phenylindole

DHT: dihydrotestosterone

DMEM: Dulbecco 's modified Eagle 's medium

DMF: dimethylformamide

DMSO: dimethylsulfoxide

EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

EGTA: ethyleneglycol tetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EMT: epithelial-mesenchymal transition

ER: estrogen receptor

FITC: fluorescein isothiocyanate

FSH: follicle-stimulating hormone

GnRH: gonadotropin-releasing hormone

GnRHR: gonadotropin-releasing hormone receptor

GR: glucocorticoid receptor

HOBt: hydroxybenzotriazole

HRP: Horseradish peroxidase

hTERT: human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit

IL-6: interleukin-6

LA: leuprolide acetate

LH: luteinizing hormone

MMP2: matrix metalloproteinase-2

MMP9: matrix metalloproteinase-9

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide

NCoR: nuclear receptor corepressor

NSCLC: non-small cell lung cancer

PCa: prostate cancer

PBS: phosphate-buffered saline

PSA: prostate-specific antigen

RT: room temperature

SDS: sodium dodecyl sulfate

SMRT: silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor

SRC-1: steroid receptor coactivator-1

TIF2: transcription intermediary factor 2

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

YAP1: yes-associated protein 1

# I. 서론

GV1001은 인간 텔로머라아제 역전사효소의 촉매 소단위(hTERT)에서 유래한 16개 아미노산의 펩타이드이다. 다양한 고형 종양의 90% 이상이 암세포의 불멸화를 유지하기 위해 정상 조직에 비해 증가된 텔로머라아제를 발현하고 있으며(Kim et al., 1994), GV1001은 증가된 텔로머라아제에 대해 면역 반응을 일으키기 위한 항암 백신으로서 개발되었다. GV1001의 접종은 hTERT를 인지하는 여러 CD4+, CD8+ T 세포에 의한 면역 반응을 촉진한다(Kyte, 2009). 최근 췌장암을 비롯한 다양한 고형 암에서 GV1001의 접종이 면역 반응을 촉진하고, 면역 반응이 일어난 환자에서 생존기간이 증가하였음이 보고된 바 있다(Bernhardt et al., 2006). 또한 뛰어난 안전성을 바탕으로 췌장암뿐만 아니라 비소세포성 폐암(NSCLC), 흑색종과 같은 암종을 대상으로 항암제로서 다양한 임상 시험이 진행되고 있다(Bernhardt et al., 2006; Brunsvig et al., 2006; Brunsvig et al., 2011; Kyte et al., 2011). 그러나 아직까지 암세포에 대한 GV1001의 직접적 항암 작용과 이를 매개하는 기전에 대한 연구는 부족하다.

전립선암은 남성에서 가장 발병율이 높은 암종이며, 미국과 유럽에서 암에 의한 사망률이 가장 높은 암종의 하나이다(Siegel et al., 2011). 전립선암 치료 요법으로는 호르몬 요법, 전립선적제술, 방사선 치료 및 항암화학요법 등이 사용되는데 증상이 심하고 전이 위험도가 높은 환자들에게 1차적으로 호르몬 요법이 단독 혹은 병용으로 다른 치료 요법과 함께 사용된다(Akaza, 2011; Cornford et al., 2017). 그러나

전립선암은 일반적인 치료 요법 후 12-18개월 이내에 악성화가 빠르게 진행되며 빈번한 재발과 빠른 전이로 인하여 사망률이 크게 높아진다(Chi et al., 2009; Devlin and Mudryj, 2009; Harris et al., 2009; Lassi and Dawson, 2010). 악성화가 진행된 경우 생존 기간은 9-30개월로 매우 짧아지게 된다(Kirby et al., 2011). 따라서 전이성 전립선암에 대한 치료 전략이 필요하며 현재까지 진단 마커와 치료 약제가 부족한 실정이다.

전립선암과 같은 호르몬-조절 종양 치료를 위해 사용되는 1차 요법인 호르몬 요법은 암세포의 성장에 가장 큰 영향을 미치는 인자인 호르몬 자극을 단절시키는 요법이다(Mottet et al., 2011). 전립선암의 경우 대표적인 남성호르몬인 테스토스테론의 조절이 타겟이 된다. 그 중에서 gonadotropin-releasing hormone(GnRH) 유사체는 생체 내에서 시상하부-뇌하수체-생식선 축의 탈감작을 일으켜 생식선에서의 테스토스테론 분비를 억제한다.

GnRH는 시상하부에서 생합성되어 외부로 분비되는 호르몬으로, 내분비계 호르몬 네트워크를 중추적으로 조절하는 중요한 호르몬이다(Millar et al., 2004; Naor and Huhtaniemi, 2013). GnRH가 시상하부에서 방출되면, 뇌하수체 성선 자극 호르몬 세포의 표면에 발현된 GnRH 수용체와 결합하여 황체 형성 호르몬(luteinizing hormone, LH) 및 여포 자극 호르몬(follicle-stimulating hormone, FSH)의 분비를 촉진한다(Schally et al., 1971). GnRH 수용체는 세포 외부-내부 루프에 의해 연결된 7 개의 transmembrane-spanning 도메인을 가진 G-단백질 결합 세포 표면 수용체(G-protein-coupled cell surface receptors, GPCR) 이다. 다른 GPCR들과 마찬가지로, GnRH 수용체는 리간드와 결합하여 하위의 다양한 G-



단백질을 활성화 시키고 세포 내로 신호를 전달한다(Hawes et al., 1993; Stanislaus et al., 1998). 뇌하수체 성선 자극 호르몬 세포에서는 GnRH 수용체가 우선적으로 Gαq-단백질과 결합하고, 내분비 활성을 갖게 되어 호르몬의 생합성 및 분비를 촉진한다(Grosse et al., 2000; Hille et al., 1994; Voliotis et al., 2018). 반대로, GnRH 수용체에 결합한 리간드에 의해 Gai-단백질이 결합하여 활성화되었을 때 GnRH 뉴런 기능 및 호르몬 분비 기능이 억제됨이 규명되어 있다(Krsmanovic et al., 2003).

GV1001의 분자적 기전을 탐구하기 위해 펩타이드의 구조 분석을 실시하였고, 그 결과 펩타이드의 아미노산 서열 일부가 GnRH와 GnRH 유사체인 leuprolide acetate(LA, GnRH 작용제) 및 cetorelix acetate(CA, GnRH 길항제)와 중첩되는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 토대로 GV1001이 GnRH 수용체에 대한 신호 전달 능력을 갖는지 연구하고자 하였다.

LA는 GnRH에서 유래한 10개 아미노산의 펩타이드이며, GnRH의 6번에 위치한 Gly과 10번에 위치한 Gly 아미노산을 각각 D-Leu와 N-ethylamide로 치환한 형태이다. 이러한 아미노산 치환 때문에 LA는 내인성 GnRH보다 GnRH 수용체에 대한 결합능이 50 배 이상 높으며, 다른 GnRH 유사체인 triptorelin과 goserelin은 각각 50 배, 100 배가 높다(Schally et al., 1971; Schally et al., 2017). GnRH 펩타이드는 세포 외부에서 단백분해효소(proteolytic enzymes)에 의해 절단되며(Cleverly and Wu, 2010; Peter et al., 1996; Yang et al., 1998), GnRH 아미노산 서열 중 Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>와 Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>의 결합이 절단되는 것으로 알려져 있다(Lasdun et al., 1989; Peter et al., 1996). 인간 GnRH 수용체에 대한 선택성이 높은

GnRH1와 달리 수용체에 대한 선택성이 낮은 GnRH2는 GnRH1의 Tyr<sup>5</sup>, Leu<sup>7</sup>, Arg<sup>8</sup>이 각각 His<sup>5</sup>, Trp<sup>7</sup>, Tyr<sup>8</sup>로 치환된 형태이며, 이는 Tyr<sup>5</sup>, Leu<sup>7</sup>, Arg<sup>8</sup>이 수용체 선택성에 크게 관여하는 residues임을 의미한다(Lu et al., 2005). 본 연구에서는 GV1001의 아미노산 서열과 GnRH 유사체의 아미노산 서열을 비교하였을 때, 수용체 선택성에 관여하는 residue를 포함하는 중첩이 수용체 활성화를 야기할 수 있는지 평가하고자 하였다.

안드로겐 수용체(AR)는 테스토스테론(testosterone)과 디하이드로테스토스테론(dihydrotestosterone, DHT)에 의해 생체 내에서 활성화되는 남성호르몬 수용체이다(Chua and Bristow, 2016). 전립선암 치료를 위한 호르몬 요법으로 AR의 작용을 억제시키는 항-안드로겐 약제들이 사용되는데, 대표적으로 flutamide, bicalutamide, nilutamide와 같은 약제들이 있다(Crawford et al., 2018). 이후 enzalutamide와 같은 약제들이 개발되어 기존의 항-안드로겐 요법의 저항성 획득에 대한 대안으로 제시되고 있지만 여전히 전립선암 치료에 있어서 저항성 획득과 빠른 전이는 해결해야 할 과제로 남아있다. 많은 연구에서 저항성 획득의 기전으로 AR의 비정상적 발현을 제시하고 있으며, 예를 들면

1) AR의 비정상적 과발현, 2) AR 변이체(splice variants), 3) AR 점돌연변이(point mutation) 그리고 4) 글루코코르티코이드 수용체(GR)의 과발현 등이 있다(Boudadi and Antonarakis, 2016).

일반적으로 안드로겐 수용체(AR), 에스트로겐 수용체(ER), 그리고 프로게스테론 수용체(PR), 글루코코르티코이드 수용체(GR)와 같은 스테로이드 수용체들은 리간드에 의해 homodimer를 형성하여 DNA 반응 부위에 결합하며, 타겟 유전자의 전사를 촉진한다. 스테로이드 수용체가

전사를 시작하기 위해서 보조활성자나 보조억제자와 같은 보조조절자 단백질들이 필요하며, 염색질을 개조하는 것과 같은 방법으로 전사 활성을 조절한다(Agoulnik and Weigel, 2009; Heemers and Tindall, 2007). AR의 전사 활성을 조절하는 보조활성자는 대표적으로 steroid receptor coactivator-1(SRC-1), TIF2, P300가 있으며, 염색질 개조를 위해 히스톤 아세틸화(histone acetyl-) 또는 메틸화(methyl-) transferase 활성을 촉진한다(Chakravarti et al., 1996; Gregory et al., 2001; Lonergan and Tindall, 2011). 대표적인 보조억제자인 silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors(SMRT)나 nuclear receptor corepressor(NCoR)은 타겟 유전자의 프로모터에 histone deacetylase 활성을 촉진함으로써 유전자의 전사를 억제한다(Li et al., 2000). 이러한 보조조절자의 역할은 암 발달을 촉진하거나 억제하는 경로를 조절하므로 정상적인 세포 활성 유지 및 암의 악성화에 중요한 역할을 한다. 최근에는 전립선암의 저항성 획득의 기전으로 AR의 비정상적 발현 변화뿐 만 아니라 안드로겐 결핍이나 AR 활성 저해 자체만으로 다양한 발암원성 신호전달을 촉진하는 것이 보고되어 있어 직접적인 AR의 억제가 아닌 AR과 결합하는 보조활성자의 조절이 치료적 타겟으로 중요하게 제시되고 있다. 예를 들어, transcription intermediary factor 2(TIF2)와 같은 AR의 보조활성자는 bicalutamide에 대한 저항성을 촉진하고, TIF2는 IL-6와 같은 자극원에 반응하여 상향조절되는 것이 보고되어 있다(Feng et al., 2009). 반대로, NKX3.1과 같은 단백질은 AR의 타겟 유전자이며 동시에 AR에 의한 증식, 종양 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다(Lei et al., 2006).

NKX3.1은 전립선 상피 인자로 알려져 있으며, 전립선암의 진행

과정에 중요한 역할을 담당하는 homeodomain 단백질이다(Wang et al., 2009). NKX3.1은 안드로겐 신호에 의해 조절되며 활성화된 AR이 타겟 유전자에 결합하여 전사를 촉진할 때 Androgen receptor binding site(ARBS)에 AR과 함께 결합하여 전립선 암 생존과 성장에 관여하는 유전자들의 전사를 조절한다(Tan et al., 2012). NKX3.1이 결손된 LNCaP 전립선암 세포주는 세포 성장과 전립선암의 림프선으로의 전이, 그리고 생체 내에서 암의 성장이 촉진된다(Magee et al., 2003; Zhang et al., 2008).

Hippo pathway는 정상적인 세포에서 종양억제 신호로서 중요한 역할을 담당한다. Hippo pathway는 세포 증식, 세포자가사멸, 줄기세포 및 전구세포의 발달을 조절하기 때문에 hippo pathway 구성 효소들의 변이나 억제 는 장기의 과성장을 유도한다(Dai et al., 2017; Mo et al., 2014; Pan, 2010; Zhao et al., 2008). Hippo pathway의 구성 효소인 MST1/2, SAV, LATS1/2는 인산화 되어 전사 인자인 YAP1을 인산화 시키고, 인산화 된 YAP1은 세포질에 축적되어 유비퀴틴화-단백분해된다. Hippo pathway와 hippo pathway에 의해 조절되는 전사 인자인 YAP/TAZ는 다음과 같은 상위 신호에 의해 조절 되는 것이 밝혀져 있다:

- 1) Rho-GTPase-Actin 세포 골격과 같은 물리적 자극의 도입 (mechanotransduction)(Dupont et al., 2011)
- 2) 메발로네이트 경로(Mevalonate pathway)와 같은 신진 대사 경로 (Enzo et al., 2015; Sorrentino et al., 2014)
- 3) Wnt/ $\beta$ -catenin 경로와 같은 줄기 세포 관련 신호(Azzolin et al., 2014)

이러한 신호들은 hippo pathway를 조절하며 YAP1의 핵 내로의 이동을 조

절한다. Hippo pathway의 비정상적인 조절로 인해 증가된 전사 인자 YAP1은 핵 내로 들어가 다양한 발암원성 유전자들의 발현을 촉진한다(Janse van Rensburg and Yang, 2016). 최근에는 YAP1이 종양 발생 단계뿐 만 아니라 암 전이를 촉진하는 핵심 인자로 주목받으며 많은 연구들이 진행되고 있다. 암세포에서 YAP1에 의해 세포 증식, reprogramming, 줄기세포화(stemness), 상피간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 그리고 항-세포자가사멸(anti-apoptosis)과 관련된 유전자들의 발현이 촉진된다는 것이 알려져 있다(Janse van Rensburg and Yang, 2016; Ling et al., 2017; Pan, 2010; Sun et al., 2016; Yu et al., 2018; Zanconato et al., 2016). 또한 YAP1은 암세포가 다양한 약물에 대한 저항성을 획득하는데 관여한다고 보고되어 있다(Hsu et al., 2016; Lee et al., 2016; Lee et al., 2015; Zanconato et al., 2016). YAP1의 기능을 저해하였을 때, 암의 진행이 억제되고 항암제에 대한 민감성이 회복되는 것이 관찰되었다(Hsu et al., 2016). 따라서 Hippo pathway를 조절하는 상위 신호를 규명하고 YAP1을 조절하여 치료적 효과를 도출해 내기 위한 연구가 필요하다. 본 연구를 통해 AR의 보조활성자인 YAP1의 역할을 규명하고 YAP1의 억제와 AR의 활성화에 따른 하위 유전자 조절과 그로 인한 전립선암 전이 억제 기전을 탐구하고자 하였다. YAP1을 인산화시킴으로써 세포질 내 축적 및 유비퀴틴화-단백분해효소 활성화에 따른 분해를 유도하는 상위 신호를 탐구하였다. 또한 YAP1의 분해에 따라 AR과의 결합이 절단되고, 하위 유전자 발현 조절을 통해 세포의 이동능을 조절할 수 있는지 평가하고자 하였다. 또한 보조조절자로서의 YAP1 결합에 따라 AR의 전사 활성이 조절될 수 있음을 규명하고자 하였고, AR의 활성 증가와 AR과 결합된 보조조절자 YAP1의 억제가 전립선암의

전이를 억제하는 제어하는 중요한 기전임을 제시하였다.

종합하면, 본 연구에서는 전립선암의 진행을 억제하는 신규 약제인 GV1001의 기능을 제시하고 그 기전을 규명하였다. 전립선암의 악성화로 인한 전이를 억제하는 핵심적인 타겟으로 AR의 보조조절자인 YAP1의 조절을 제시하였다. 또한 YAP1의 상위 조절 신호 및 AR의 활성화 신호로 작용하는 Gαs-cAMP 신호의 선택적 활성화를 통해 전이에 관여하는 타겟 유전자의 발현 억제, 결과적으로 생체 내 전립선암의 증식 및 전이에 대한 억제 효과를 검증하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### II-1. 시약 및 재료

GnRHR, AR, NKX3.1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Poly(ADP-ribose) polymerase(PARP) 1, cleaved PARP(cl-PARP1), cleaved caspase3(cl-casp3), Bcl-2, p-AR, YAP/TAZ, p-YAP 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구매하였다.  $\beta$ -actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Horseradish peroxidase(HRP)-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgGs는 Cell Signaling으로부터 구입하였다. GV1001 펩타이드와 fluorescein isothiocyanate(FITC)-결합 GV1001은 GemVax & KAEL (Seongnam, Kyeonggi-do, South Korea)이 공급했다. Leuprolide acetate(LA)와 cetorelix acetate(CA), R10A, R12A mutant 펩타이드는 Anygen (Gwangju, South Korea)에서 구입하였다.

### II-2. 세포 배양

LNCaP (안드로겐 수용체 양성 인간 PCa 세포주) 및 PC-3 (안드로겐 수용체 음성 PCa 세포주), N87 (인간 위암 세포주) 세포를 10 % 소 태아 혈청 (Hyclone, Logan, UT, USA) 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (100 U/ml, Hyclone) 을 함유하는 RPMI-1640 배지를 이용하여 배양하였다. HEK293 세포는 10 % 태아 소 혈청 (Hyclone) 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신 (100 U/ml)을 갖는 Dulbecco 's modified Eagle 's

배지(DMEM)에서 배양 하였다. 모든 배양 조건은 37 °C에서 5 % CO<sub>2</sub> 환경에서 유지되었다.

### **II-3. 리간드-수용체 결합능 평가**

HEK293 세포는 100 mm<sup>2</sup> plate에서 배양되었고, 세포 스크레이퍼를 사용하여 500 µl 차가운 PBS에서 수확하였다. 세포를 25G 바늘에 10 번 통과시키고, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM EGTA 와 단백분해효소 저해제를 함유하는 균질화 완충액으로 균질화 시킨 후 720 g에서 5 분간 원심 분리 하였다. 샘플을 10,000 g에서 원심 분리하고, 상등액을 100,000 g 에서 1 시간동안 초 원심 분리 (Optima-XE100, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) 하였다. 세포막 구획을 함유하는 펠렛을 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 250 mM 수크로오스, 1 mM EGTA 및 단백분해효소 저해제를 함유하는 차가운 샘플 완충액으로 재현탁시켰다. TEDG 버퍼 (0.3 ml (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1.5 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 10% glycerol)에서 4 °C에서 1 시간동안 FITC-결합 GV1001 (0.3 및 3 mM)과 혼합하였다. 혼합물 중의 유리 리간드를 분리하기 위해, 혼합물을 세척 완충액 (50 mM Tris base, pH 8.0)으로 3 회 세척하였다. FITC-결합 GV1001 펠렛을 샘플 완충액으로 재현탁하고 형광측정기 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)를 사용하여 분석하였다.

### **II-4. 스트렙타아비딘-비오틴 결합 평가 (Streptavidin-Biotin binding assay)**

총 세포 lysate (300 µg/ml)를 4 nmol의 비오틴-결합 GV1001과 4 °C에서 8



시간동안 배양하여 결합하도록 완만하게 회전시켰다. 150  $\mu$ l의 스트렙타아비딘 결합 비드(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 2 % 소 혈청 알부민이 포함된 PBS로 15 분간 블로킹 한 후, 비오틴-결합 GV1001 전 배양된 세포 용해물과 함께 배양하였다. 비오틴-결합 GV1001이 없는 세포 용해물-비드 혼합물을 음성 대조군으로 사용하였다. 스트렙타아비딘-비오틴 복합체 결합 단백질을 SDS 로딩 완충액에서 10 분간 boiling하여 용출시키고 GnRHR 웨스턴 블랏팅을 진행하였다.

## II-5. FITC-표지 GV1001을 이용한 세포 내 위치 평가

LNCaP 세포를 24시간동안 8-챔버 유리 슬라이드 (Lab-Tek, Nunc, Rochester, NY, USA)에서 배양하였다. 10  $\mu$ M FITC-결합 GV1001 펩타이드를 배양 배지에 첨가하고 16 시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 실온에서 20 분동안 4 %-파라 포르말데히드로 고정시켰다. 세포를 DAPI로 1 분동안 염색하여 핵을 시각화하였다. PBS로 세척한 후, 커버 슬립을 장착하고 공초점현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 촬영하였다.

## II-6. 세포 내 칼슘 정량

커버 슬립에서 배양 된 LNCaP 및 HEK293 세포는 생리 식염수 (PSS; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.5 mM 글루코오스 그리고 10 mM HEPES, pH 7.4)에 포함된 1  $\mu$ M fura-2/AM 과 1 % 소 혈청 알부민과 함께 1 시간 동안 배양하였다. 커버 슬립은 현미경 스테이지에 superfusion 챔버에 장착하고 2 ml/min의

속도로 PSS로 지속적으로 superfusion 시켰다. 모든 실험은 33 °C 에서 수행되었다. 세포는 S Fluor 40X (N.A. 1.30, oil) objective lens가 장착된 Nikon Eclipse Ti-U inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan), Evolve 512 electron multiplying charge coupled device(EMCCD) 카메라 (Photometrics, Tucson, AZ, USA)를 이용하여 촬영되었다. Fura-2에 사용된 excitation, emission 파장은 각각 340/380, 535 nm 이다. 이미지는 Meta Imaging System (Molecular Devices, West Chester, PA, USA)를 이용하여 얻어진 후 분석되었다.

## **II-7. 리포터 유전자 분석 (Reporter gene assay)**

LNCaP 세포 ( $1 \times 10^5$  cells/well)을 48-well plate에서 배양 한 후, cAMP-response element(CRE) 또는 androgen-response element(ARE)를 함유하는 루시페라아제 리포터 플라스미드로 형질 도입 시켰다. 형질 도입된 세포를 24 시간 동안 화합물에 노출시키고, 루시페라아제 리포터 분석 시스템 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 프로모터 활성을 측정하였다. 세포 용해물에서의 firefly와 hRenilla 루시페라아제 활성을 luminometer (LB960, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)를 이용하여 측정하였다. 상대적 루시페라아제 활성은 phRL-SV (hRenilla) 루시페라아제 비율로 나누어 계산하였다.

## **II-8. 면역화학적 분석 (Immunoblot analysis)**

세포 용해물에서 얻은 동량의 단백질을 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide 젤 전기영동법(SDS-PAGE)으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켰다. 5 % 탈지유 용액에 1 시간 반응시킨

후 1차 항체로 반응시켰다. 그 후 2차 항체로 HRP-conjugated IgG를 1 시간 반응시키고 ECL chemiluminescence system (GE Healthcare)를 사용하여 발색하였다.

## II-9. cDNA의 Realtime RT-PCR

TRIzol을 사용하여 세포 및 조직에서 추출한 총 RNA(1 µg)에서 cDNA를 얻었다. PCR은 다음의 선택적 primer들을 사용하여 진행되었다. human MMP2 (sense: 5'-ATAACCTGGATGCCGTCGT-3', antisense: 5'-AGGCACCCTTGAAGAAGTAGC-3'), human MMP9 (sense: 5'-GAACCAATCTCACCGACAGG-3', antisense: 5'-GCCACCCGAGTGTAACCATA-3'), human GnRHR (sense: 5'-TTGCCTTTTTAAACCCATGC-3', antisense: 5'-AACATGCTCCAACATTTGTG-3'), human AR (sense: 5'-AGGATGCTCTACTTCGCCCC-3', antisense: 5'-ACTGGCTGTACATCCGGGAC-3'), human PSA (sense: 5'-ACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAA-3', antisense: 5'-CCCCAGAATCACCCGAGCAG-3'), human NKX3.1 (sense: 5'-GCCGCACGAGCAGCCAGAGACA-3', antisense: 5'-TTCAGGGCCGGCAAAGAGGAGTG-3'), human CTGF (sense: 5'-CAAGGGCCTCTTCTGTGACT-3', antisense: 5'-ACGTGCACTGGTACTTGCAG-3'). MMP2 와 MMP9 mRNA 수준은 β-actin (sense: 5'-GATGAGATTGGCATGGCTTT-3', antisense: 5'-GTCACCTTCACCGTTCCAGT-3') mRNA 수준 값으로 보정하였다. GnRHR,

AR, PSA, NKX3.1, CTGF mRNA 수준은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, sense: 5'-AAGGCTGAGAACGGGAAG-3', antisense: 5'-GCCCCACTTGATTTTGA-3') mRNA 값으로 보정하였다. SYBR green real-time PCR 증폭은 MiniOpticon real-time PCR 분석 시스템 (Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

## II-10. 형질도입 (Transfection)

1) GnRHR 과발현 stable cell line 구축: 6-well plate의 70 % 정도 배양된 HEK293 세포에 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 pcDNA3.1(+) 및 pcDNA3.1(+)-GnRHR 벡터를 도입시켰다. Geneticin-저항성 콜로니를 G418 (800 µg/ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 처리하여 선별하였다.

2) siRNA(Small interfering RNA) 이용한 Knock-down 모델 구축: 내인성 GnRHR 발현을 일시적으로 knock-down 시키기 위해, LNCaP 세포에 75 nmol/l GnRHR siRNA (catalog nos: SASI\_HS02\_00302488, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 또는 비선택성 음성 대조군으로 control siRNA (catalog nos: SI001, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 Lipofectamine 2000을 이용하여 도입시켰다.

3) CRISPR-cas9 시스템을 이용한 Knock-out 모델 구축: 내인성 GnRHR, AR 및 YAP1 발현을 knock-out 시키기 위해, LNCaP 세포에 U6-GnRHR/CMV-cas9-RFP (HS0000014744), U6-AR/CMV-cas9-RFP (HS0000000952), U6-YAP1/CMV-cas9-RFP (HS0000121498) 플라스미드

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 음성 대조군으로 플라스미드의 backbone 만을 가지는 플라스미드를 Lipofectamine 2000을 이용하여 세포 내로 도입하였다. GnRHR, AR 및 YAP1을 knock-out 시킨 stable cell 제작을 위해서 transfection 된 세포 중 RFP 발현을 BD Aria FACS cell sorter (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분류한 후, single cell을 96-well plate에 옮겨 배양하였다.

4) Retrovirus 시스템을 이용한 YAP5SA 과발현 모델 구축: 6-well plate의 70 % 정도 배양된 LNCaP 세포에 AmphoPhoenix retrovirus 패키징 세포에 MSCV-YAP5SA를 도입하여 얻은 virus sup(culture supernatants)을 14 일 동안 매일 2 회 감염시켰다. Virus sup은 도입 72 시간 후 얻어졌으며, 0.45- $\mu$ M microfunnel filter (Paul life sciences, Port Washington, NY, USA)를 이용하여 필터한 후 -70 °C에 분주하여 저장하였다.

## II-11. 세포 증식 분석법

1) MTT 정량 분석법: LNCaP, PC-3 세포주를  $1 \times 10^3$  cells/well로 96-well plate에서 배양한 후 2 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)를 넣어 4 시간 동안 반응시켰다. 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide (DMSO)를 0.2 ml/well씩 넣어 MTT formazan을 용해한 후, 540 nm의 흡광도에서 ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA)로 흡광도를 측정하였다.

2) IncuCyte ZOOM live-cell 분석 시스템: control siRNA 및 GnRHR siRNA 도입 LNCaP 세포주를  $1 \times 10^3$  cells/well로 96-well plate에서

배양한 후 증식 가능한 세포 수를 IncuCyte label-free 세포 단층 합류(confluency) 알고리즘을 이용하는 IncuCyte ZOOM live-cell 시스템 (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)을 통해 측정하였다.

## II-12. 염색질면역침전법 (Chromatin immunoprecipitation assays)

LNCaP 세포에 24 시간 동안 GV1001 (10  $\mu$ M)과 LA (100 nM), DHT (100 nM) 처리 후 포름알데히드로 염색질과 cross-linking 시켰다. EZ-ChIP assay kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)를 사용하여 제공된 실험법에 따라 수행하였다. Real-time PCR은 PSA, NKX3.1, CTGF의 유전자 프로모터에 AR 결합 부위를 포함하는 프라이머를 사용하였고 그 서열은 다음과 같다. PSA (sense: 5'-GCTAGCACTTGCTGTTCTGC-3', antisense: 5'-GGGATCAGGGAGTCTCACAA-3'), NKX3.1 (sense: 5'-CCGAGCCAGAAAGGCACTTG-3', antisense: 5'-CTTAGGGGTTTGGGGAAGCC-3'), CTGF (sense: 5'-TGTGCCAGCTTTTTCAGACG-3', antisense: 5'-TGAGCTGAATGGAGTCCTACACA-3').

## II-13. 체외 세포의 이동성 분석법

1) H&E 염색법: 세포의 이동성 분석은 폴리카보네이트 필터로 된 24-well transwell unit (Corning Coster, Cambridge, MA)을 사용하여 수행하였다.  $1 \times 10^5$  cells/ml 농도의 LNCaP, PC-3 세포 및 형질 도입한 LNCaP 세포주를 type I 콜라겐(Collaborative Research, Lexington, KY)으로 필터 아래가 코팅된 상기 transwell plate의 상부에

위치시키고 세포를 약물 처리와 함께 18 시간 동안 배양하였다. 메탄올을 사용하여 세포를 고정한 후, hematoxylin에 10분, eosin에 4분간 염색한 뒤, 현미경 (60 배율)으로 관찰하여 필터의 하부로 이동한 세포의 수를 세어 세포의 이동능을 평가하였다.

2) IncuCyte ZOOM live-cell 분석법:  $5 \times 10^4$  cells/ml 농도의 LNCaP 세포 및 형질 도입한 LNCaP 세포주를 60  $\mu$ l 씩 transwell plate (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)의 상부에 위치시키고 약물 처리와 함께 24 시간 동안 배양하였다. 하부로 이동한 세포 수는 IncuCyte ZOOM live-cell 분석 시스템을 이용하여 측정하였다.

#### II-14. 면역침강법 (Immunoprecipitation)

AR과 YAP1 및 NKX3.1의 결합을 관찰하기 위해 세포 용해물의 단백질 500  $\mu$ g에 표적 단백질에 대한 항체 3  $\mu$ g을 넣고 4 °C에서 18 시간 반응시켰다. 항원-항체 결합체를 단백질 G-agarose 비드와 4 °C에서 2 시간 동안 반응시킨 후 침전시키고 끓는 물에 5 분간 반응시켰다. 추출된 단백질을 면역화학적 방법으로 관찰하였다.

#### II-15. Caspase-3/7 활성 평가

제조사의 지시법에 따라 IncuCyte ZOOM live-cell 분석 시스템으로 caspase-3/7 활성을 평가하였다. LNCaP, PC-3 세포를 96-well plate ( $3 \times 10^3$  cells/well)에 접종하고, GV1001 (0.1-10  $\mu$ M), 100nM LA 및 100 nM CA를 포함 또는 불포함한 상태에서 96 시간 동안 배양하였다. 희석된 apoptosis 시약 (IncuCyte, Car No 4440, Essen BioScience, 5  $\mu$ M)을 동시에

배양액에 첨가하였다. 세포를 IncuCyte ZOOM live-cell 분석 시스템에 넣고 37 °C에서 5 % CO<sub>2</sub> 환경에서 매 4 시간 마다 스캔하였다.

## **II-16. 암 성장 마우스 병리 모델 (Xenograft nude mouse model)**

5주령 수컷 BALB/c-nude 마우스 (Raon Bio Inc., Seoul, South Korea)에  $1 \times 10^6$  LNCaP 세포를 포함하는 0.1 ml PBS를 피하 접종 하였다. 종양이 유의적으로 자랐을 때 ( $>150 \text{ mm}^3$ ), 마우스를 무작위로 5 그룹으로 나누고 음성대조군(PBS), GV1001 (0.1, 1, 10 mg/kg/일) 또는 LA (0.1 mg/kg/일)을 피하 주사 하였다. 14 일 동안 마우스를 일주일에 두 번 모니터링 하고 종양의 길이와 너비를 calipers로 검출하여 종양 부피를 공식 (길이 $\times$ 넓이 $\times$ 넓이 $\times 0.52$ )를 사용하여 계산하였다. 모든 동물 실험은 NIH 동물 사용 지침에 따라 수행되었으며 본 연구는 서울대학교 동물 실험 및 사용위원회의 승인을 받았다.

## **II-17. TUNEL 분석법 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay)**

TUNEL 분석은 ApopTaq Peroxidase in situ apoptosis detection kit (Chemicon, Temecula, CA, USA)를 이용하여 파라핀 삽입 절편에서 제조사의 지시에 따라 수행되었다. 양성 반응은 3,3-diaminobenzidine으로 시각화 한 후, methylgreen 염색을 이용하여 핵 대조 염색을 수행하였다. TUNEL로 표지 된 세포는 고배율 영역 당 양성 영역의 백분율로 정량화 되었다. 개별 동물의 종양 조직에서 총 10개의 부위로 분석되었다. 데이터는 TUNEL 양성 영역의 백분율로 표현되었다.



## II-18. 면역조직화학염색 (Immunohistochemistry)

- 1) 면역 조직화학적 염색: 암조직 검체를 10 % neutral buffered formalin에 고정하여 제작한 파라핀 포매 조직을 4  $\mu$ m 두께로 박절하여 슬라이드에 표본을 부착하였고, Ki-67 항체를 반응시켜 염색하였다.
- 2) 형광면역염색: 4 %-파라 포르름 알데히드로 고정한 세포를 0.3 % Triton X-100으로 permeabilization 시키고 AR, YAP1, p-YAP1 항체로 반응시켰다. Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG와 Alexa Fluor 568 및 488-conjugated anti-mouse IgG (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 2차 항체로 반응시켜 형광 표지 한 후 hoechst 33342 NucBlue® Live ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 포함된 봉입물질을 넣고 커버 슬립으로 밀봉하였다.

## II-19. 마우스 혈중 테스토스테론 정량

6주령 수컷 BALB/c-nude 마우스 (Jung Ang Lab Animal Inc., Seoul, South Korea)에 GV1001 (10 mg/kg/일) 또는 음성대조군 (PBS)를 7일간 피하주사 하였다. 채혈은 모세관채혈튜브를 이용하여 안와정맥총에서 첫 투여 후 4시간, 마지막 투여 후 4시간 후에 수행하였다. 혈장 내 테스토스테론 농도는 testosterone ELISA kit를 사용하여 정량하였다 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA).

## II-20. 비장-간 전이 마우스 병리 모델

5주령 수컷 BALB/c-nude 마우스 (Raon Bio Inc., Seoul, South Korea)의 비장에  $1 \times 10^5$  LNCaP 세포를 포함하는 0.1 ml PBS를 접종 하였다. 3

일간 안정화 시킨 후, 마우스를 무작위로 3 그룹으로 나누고 음성대조군(PBS), GV1001 (10 mg/kg/일) 또는 LA (0.1 mg/kg/일)을 피하 주사 하였다. 4 주 동안 약물을 투여하며 마우스를 일주일에 두 번 모니터링 하고 마우스 체중을 관찰하였다. 4 주 후 마우스를 sacrifice하고 간과 비장 전체를 적출 한 뒤, 간으로 전이된 암 면적을 평가하기 위해 간조직 전체를 고정하고 파라핀 블록으로 포매하였다. 모든 동물 실험은 NIH 동물 사용 지침에 따라 수행되었으며 본 연구는 서울대학교 동물 실험 및 사용위원회의 승인을 받았다.

## II-21. 통계분석

통계 분석은 one-way ANOVA와 Tukey's post hoc multiple comparison을 사용하여 유의적인 차이를 결정하였다. 데이터는 산술평균  $\pm$  SD로 표기하였으며 통계적 유의성은 \* $P < 0.05$ 와 \*\* $P < 0.01$ 을 기준으로 하였다. 비장-간 전이 마우스 병리 모델의 전이 빈도 차이는 기대값이 5 미만인 셀의 비율이 전체 셀의 25%를 넘으므로 Fisher의 정확 검정을 사용하였다.

### III. 연구 결과

#### 1) GV1001의 전립선암 억제 효과 및 타겟 규명

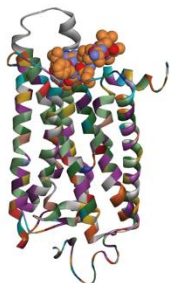
##### 1-1. GV1001과 GnRH 구조 유사체들의 펩타이드 구조 분석 (structural superposition)

GV1001의 분자적 기전을 탐구하기 위해 펩타이드의 구조 분석을 실시하였고, 그 결과 GV1001의 아미노산 서열 일부가 GnRH와 GnRH 유사체인 leuprolide acetate (LA, GnRHR 작용제) 및 cetorelix acetate (CA, GnRHR 길항제)와 중첩되는 것을 확인하였다 (Fig. 1A, B). 이 서열은 GnRH 유사체가 수용체와 결합하는 데에 핵심적인 역할을 담당할 것으로 예측되었고, 실제로 상동성 모델링 연구 (homology modeling approaches)에 근거하여 인간 GnRH 수용체 구조를 예측한 결과 GV1001이 GnRH 수용체에 도킹하는 포켓이 있을 것으로 분석되었다 (Fig. 2A-D). GV1001의 GnRH 수용체 결합능을 평가하기 위하여 GV1001-FITC 복합체와 GV1001-비오틴 복합체를 합성하고, GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포주를 구축하였다 (Fig. 1C). GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포에서 세포막구획을 분리하여 GV1001-FITC와 세포 외 결합 반응을 확인하였다. GV1001-FITC 농도 의존적으로 세포막구획의 형광발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1D). Streptavidin을 이용하여 GV1001-비오틴 복합체와 결합한 GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포 내 단백질을 침강시키고, GV1001-비오틴 복합체와 결합된 GnRH 수용체가 존재하는 것을 확인하였다 (Fig. 1E). 이러한 결과는 GV1001이 GnRH 수용체와 직접 결합할 수 있음을 시사한다.

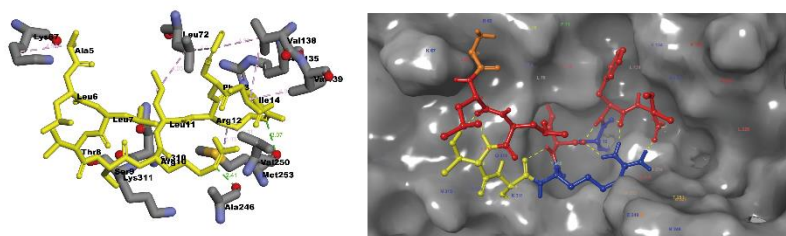


**Figure 1. Binding of GV1001 to GnRHR.** (A) Peptide structures of GV1001 and GnRH. Red-colored residues are overlapped with GnRH. (B) Peptide superposition analysis showing structural comparison between GV1001 and GnRH analogues, leuprolide acetate (LA) and cetrorelix acetate (CA). (C) Western blot analyses of GnRHR in HEK293-pcDNA3.1(+) and HEK293-GnRHR cells. Data represent means  $\pm$  SD, \*P<0.05 versus pcDNA3.1(+)-transfected control. (D) Fluorescence intensity was quantified to measure FITC-labeled GV1001 binding to membrane fraction from GnRHR-overexpressing or mock-transfected HEK293 cells. Data represent means  $\pm$  SD (n=3, \*P<0.05 versus pcDNA3.1(+)-transfected control. (E) Streptavidin-biotin binding assays were performed to confirm the direct interaction between GV1001 and GnRHR.

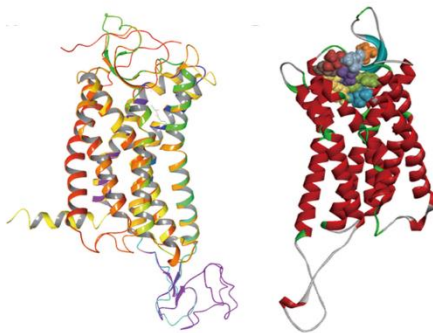
A



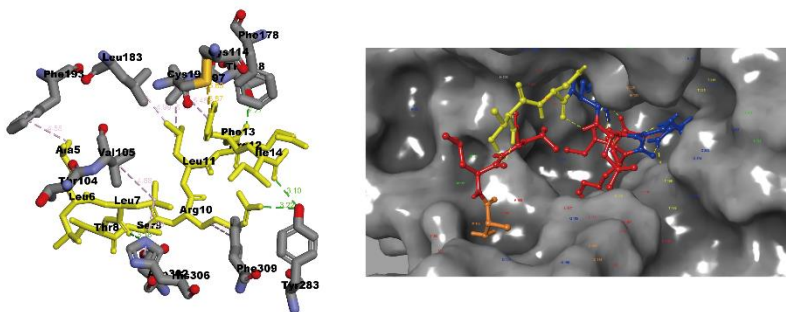
B



C



D



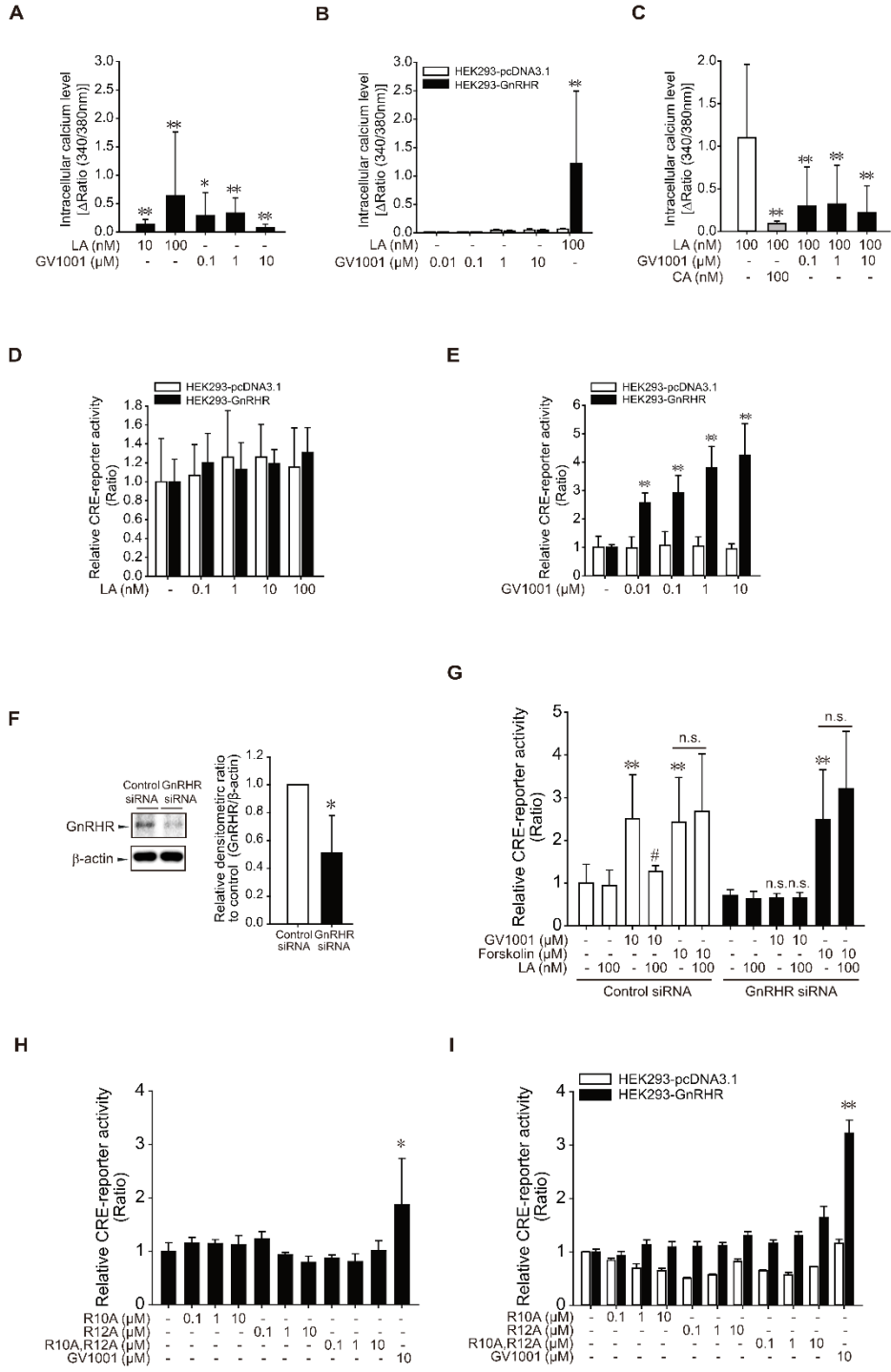
**Figure 2. Docking studies of GV1001 to GnRHR.** (A) Overall architecture of the first hGnRHR homology model from Bovine Rhodopsin and GV1001 bound ECL of hGnRHR. Atoms of GV1001 are shown as spheres. (B) Residues of hGnRHR within 5 Å of GV1001 in the first hGnRHR homology model (Left) GV1001: yellow stick, green dashed lines: hydrogen bond interaction, pink dashed lines: hydrophobic interaction. (Right) Molecular surface of hGnRHR: gray solid, GV1001: ball & stick with colors assigned by Kyte-Doolittle hydrophobic scale, yellow dashed lines: hydrogen bond interaction. (C) (Left) Superimposed structures of the second hGnRHR homology model and APJR-AMG3054-bound Human Apelin Receptor (PDB:5VBL) form a hydrogen-bond network with conserved amino acids, (Right) Overall architecture of the second hGnRHR homology model and GV1001 bound ECL of hGnRHR. Atoms of GV1001 are shown as spheres. (D) Residues of hGnRHR within 5 Å of GV1001 in the second hGnRHR homology model (Left). Molecular surface of hGnRHR(Right).

## 1-2. GV1001에 의한 GnRH 수용체 하위 신호 전달 평가

GV1001과 GnRH 수용체 결합 후 GnRH 수용체 하위의 G-단백질을 통한 신호전달이 활성화되는지 알아보하고자  $G\alpha_q$ -단백질에 의해 유도되는 세포내 칼슘 수준과  $G\alpha_s$ -단백질에 의해 유도되는 cAMP-response element(CRE)가 포함된 프로모터 활성을 정량하였다. 알려진 GnRH 수용체 작용제인 LA 처치에 의해 LNCaP 전립선암 세포주의 세포내 칼슘 수준이 증가하였다 (Fig. 3A). 그러나 GV1001 처치에 의한 세포내 칼슘 수준 증가는 미비했다 (Fig. 3A). GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포주의 세포내 칼슘 수준은 LA 처치에 의해 크게 증가했으나 GV1001 처치에 의한 증가는 유의미하지 않았다 (Fig. 3B). GV1001과 GnRH 수용체 결합이 LA 처치에 의한 세포내 칼슘 수준 증가에 영향을 미치는지 확인하기 위해 LNCaP 세포주에서 GnRH 수용체 길항제인 CA와 GV1001을 각각 LA와 병용 처치하였다. LA 처치에 의해 증가한 세포내 칼슘 수준이 CA 처치에 의해 억제되었고, GV1001 처치에 의해 유의하게 억제되었다 (Fig. 3C). 이 결과들은 GV1001이 LA와 경쟁적으로 GnRH 수용체를 경유하며 LA 처치에 의한  $G\alpha_q$ -단백질 유도-세포내 칼슘 수준 증가와 길항함을 나타낸다. LA 처치에 의해  $G\alpha_s$ -단백질에 의해 유도되는 cAMP 활성 증가가 관찰되는지 평가하였다. 그러나, GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포주에서 LA 처치에 의해 CRE 리포터 활성은 관찰되지 않았다 (Fig. 3D). 반면에, GV1001의 처치에 의해 리포터 활성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 3E). GV1001의 처치에 의해 유도된 리포터 활성이 GnRH 수용체에 의존적인지 알아보하고자 GnRH 수용체 siRNA를 이용 GnRH 수용체 결핍 LNCaP-세포주를 구축하였다



(Fig. 3F). 대조군 세포에서 LA 병용 처치는 GV1001-유도 CRE 리포터 활성을 억제하였다 (Fig. 3G). 그러나 GnRH 수용체 siRNA가 도입된 HEK293 세포주에서 GV1001 처치에 의한 리포터 활성이 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 3G). GnRH 수용체를 경유하지 않는 cAMP 활성화제인 forskolin의 처치에 의해 증가된 리포터 활성은 LA 처치에 의해 억제되지 않았다 (Fig. 3G). GV1001과 GnRH 수용체간의 도킹 시뮬레이션(Fig. 2A-D) 결과를 바탕으로 GV1001-GnRH 수용체 결합의 핵심 아미노산으로 예측된 아미노산(Arg10, Arg12)의 mutant 펩타이드를 합성하여 G $\alpha$ s-단백질에 의해 유도되는 cAMP 신호가 GV1001-GnRH 결합에 의존적인지 확인하고자 하였다. LNCaP 세포주와 GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포주 모두에서 mutant 펩타이드를 처치하였을 때 cAMP 신호는 전혀 관찰되지 않았다 (Fig. 3H, I). 이러한 결과는 GV1001이 GnRH 수용체와 결합하여 G $\alpha$ s-단백질 유도-cAMP 신호를 선택적으로 증폭시키며 G $\alpha$ q-단백질 유도-세포내 칼슘 증가 신호는 선택적으로 길항하고 있음을 시사한다.



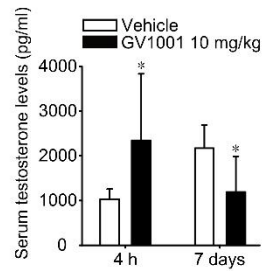
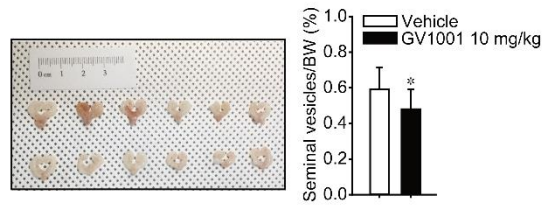
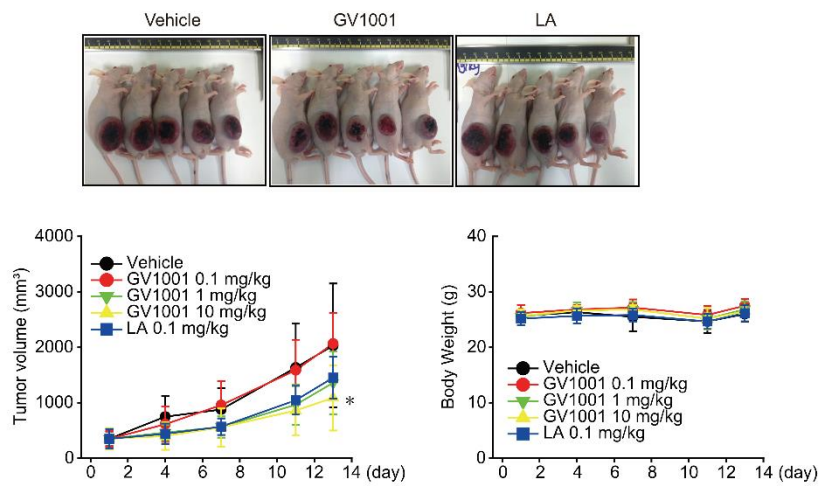
**Figure 3. Selective activation of Gas-cAMP pathway by GV1001.** (A, B) Intracellular calcium increase by GV1001 or LA. (A) LNCaP cells were incubated with LA (10 and 100 nM) or GV1001 (0.1-10  $\mu$ M) for 60 min. Data represent means  $\pm$  SD (n=12-29, \*P<0.05, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (B) HEK293-pcDNA3.1(+) and HEK293-GnRHR cells were incubated with LA (100 nM) or GV1001 (0.01-10  $\mu$ M) for 60 min. (C) GV1001-mediated functional antagonism on intracellular calcium increase by LA. LNCaP cells were exposed to 100 nM LA for 60 min in the presence or absence of GV1001 (0.1-10  $\mu$ M) or 100 nM CA. Effects of LA (D) and GV1001 (E) on CRE-luciferase activity in HEK293-pcDNA3.1(+) and HEK293-GnRHR cells. HEK293-pcDNA3.1(+) and HEK293-GnRHR cells were transiently transfected with CRE-luciferase plasmid (1  $\mu$ g/ml) and the cells were exposed to LA (0.1-100 nM) or GV1001 (0.01-10  $\mu$ M) for 24 h. Data represent means  $\pm$  SD (n=4, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (F) Silencing of GnRHR by siRNA. (G) LA-mediated functional antagonism on GV1001-induced increase in CRE-luciferase activity. (H, I) Arg10- and Arg12-dependent activation of Gas/cAMP pathway by GV1001. LNCaP cells (H) or HEK293-pcDNA3.1(+) and HEK293-GnRHR cells (I) were exposed to 10  $\mu$ M GV1001 or Arg10-, Arg12- and both of them-substituted GV1001 peptides (10  $\mu$ M) for 24 h.

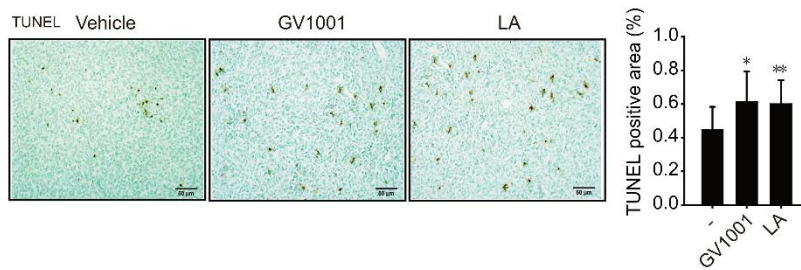
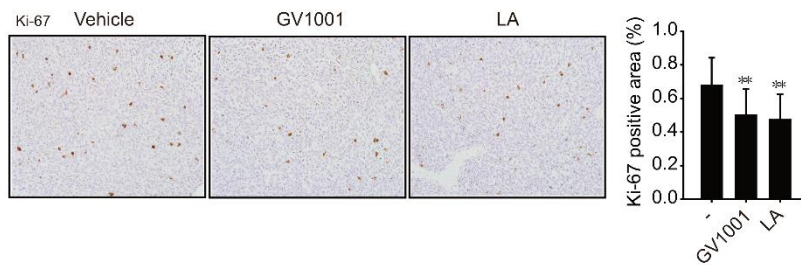
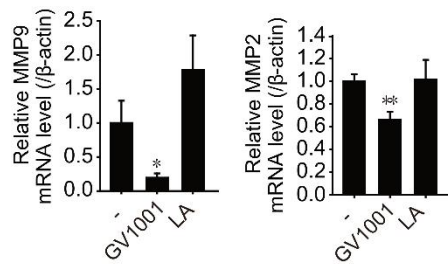
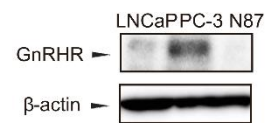
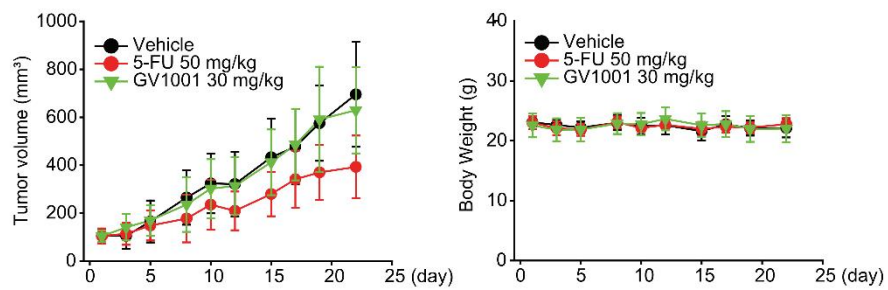
### 1-3. GV1001에 의한 전립선 종양 억제 효과

시상하부에서 방출되는 내인성 GnRH 및 GnRH 유사체는 뇌하수체 호르몬 분비 세포에 발현된 GnRH 수용체에 결합하여 황체형성호르몬 (luteinizing hormone, LH) 및 여포 자극 호르몬 (follicle-stimulating hormone, FSH)의 분비를 촉진하고, 결과적으로 생식선에서 스테로이드 호르몬의 분비를 촉진한다(Clayton, 1988). 그러나 GnRH 유사체를 반복하여 투여하게 되면 GnRH 수용체의 탈감작이 일어나고, 이로 인한 생식선의 테스토스테론 분비 억제가 전립선암 억제 효과의 기전으로 잘 알려져 있다(Conn and Crowley, 1994). 우리는 GV1001이 기존의 GnRH 유사체와 마찬가지로 뇌하수체 호르몬 분비 시스템에 영향을 미치는지 평가하고자, GV1001 (10 mg/kg, 매일 투여, 피하 주사, 7일간 투여)을 BALB/c 마우스에 투여한 후 혈중 테스토스테론 수치를 측정하였다. 첫 투여 후 4시간이 경과하였을 때, GV1001을 투여한 그룹의 혈중 테스토스테론 수치는 대조군에 비하여 약 2.3배 증가하였다 (Fig. 4A). 그러나 7일 후, GV1001을 투여한 그룹의 혈중 테스토스테론 수치는 대조군에 비하여 현저히 낮아져 있었다 (Fig. 4A). 또한, 7일간 매일 GV1001을 투여한 마우스 그룹의 정액 소포 무게가 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다 (Fig. 4B). 이러한 결과는 GV1001의 반복 투여가 뇌하수체 호르몬 분비 시스템에 영향을 주며 생식선에서 테스토스테론 분비를 억제한다는 것을 의미한다.

GV1001의 GnRH 수용체에 대한 기능이 전립선 종양에 영향을 미치는지 평가하고자 LNCaP 세포주를 이용하여 마우스 이중 이식 실험을 시행하였다. GV1001의 투여(10 mg/kg, 매일 투여, 피하 주사,

13일간 투여)에 의해 LNCaP 전립선 종양의 성장이 억제되었다 (Fig. 4C). 종양 조직에서 진행한 TUNEL 분석을 통해 세포자가사멸을 평가한 결과 GV1001 투여에 의해 암세포의 세포자가사멸이 유도되었다 (Fig. 4D). 또한 종양 성장의 지표인 Ki-67의 면역조직화학 염색을 통해 암세포 성장이 GV1001 투여에 의해 감소되었음을 확인하였다 (Fig. 4E). 종양 조직에서 암세포 전이의 대표적인 지표인 MMP2와 MMP9의 mRNA 발현이 GV1001 투여에 의해 유의적으로 감소한 것을 확인하였다 (Fig. 4F). GV1001의 효과가 종양 선택적인지 알아보기로 N87-위암 세포주를 이용하여 마우스 이종 이식 실험을 진행하였다. 암세포 내 GnRH 수용체의 단백질 발현은 LNCaP, PC-3 전립선암 세포주와 비교하여 현저히 낮은 수준을 보였다 (Fig. 4G). GV1001 투여는 N87 세포주 종양에 대해 유의미한 효과를 보이지 않았다 (Fig. 4H). 이상의 결과들은 GV1001이 GnRH 수용체 선택적 리간드이며 GnRH 수용체를 경유하여 전립선암 성장을 저해함을 지지한다.

**A****B****C**

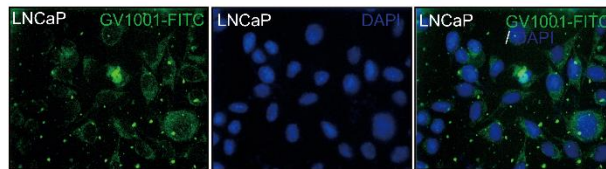
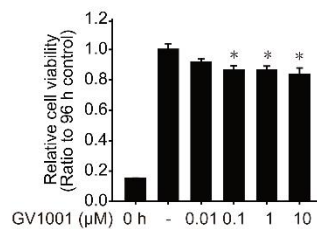
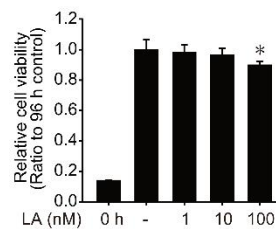
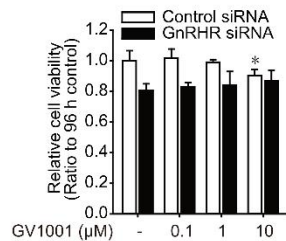
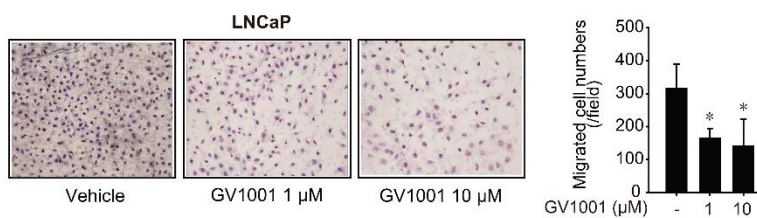
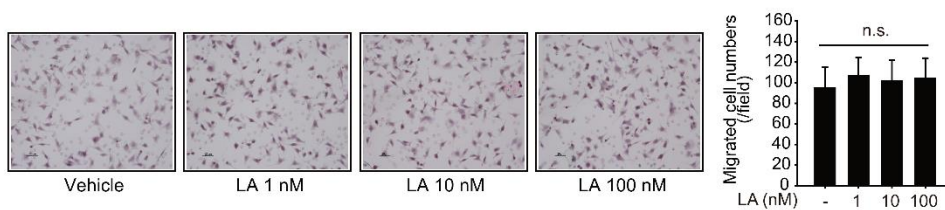
**D****E****F****G****H**

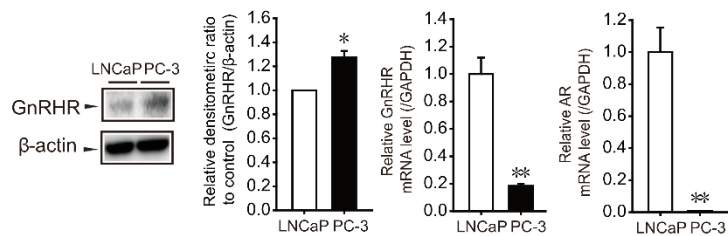
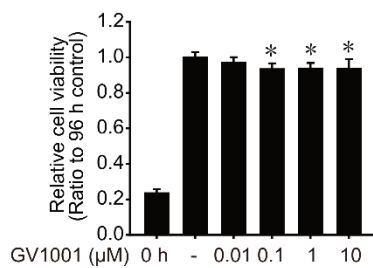
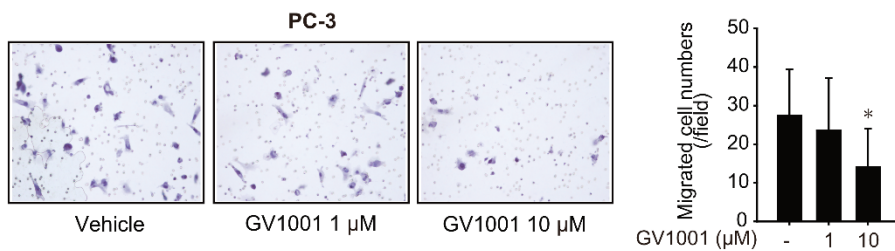
**Figure 4. *In vivo* anti-cancer effect of GV1001.** (A) Testosterone level in the serum of vehicle or GV1001 (10 mg/kg)-injected BALB/c mice was measured by ELISA. Data represent means  $\pm$  SD (n=10, \*P<0.05, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control group). (B) Whole mounts of seminal vesicles collected from BALB/c mice after 7 days treatment of either vehicle or GV1001 (10 mg/kg). Quantitative analysis of seminal vesicle weights (% body weight) was presented as mean  $\pm$  SD (n=10, \*P<0.05 versus vehicle-treated control group). (C) Tumor growth of LNCaP cells-implanted xenografts. Upper panel, representative images of tumor-bearing mice injected with vehicle, GV1001 (10 mg/kg) or LA (0.1 mg/kg) on 14 days after treatments; Lower panel, time-dependent changes in tumor volume and body weight. Data represent means  $\pm$  SD (n=5, \*P<0.05 versus vehicle-treated control group). (D) TUNEL assay of the xenograft tumor sections from the mice treated with vehicle, GV1001 (10 mg/kg) or LA (0.1 mg/kg). (E) Ki-67 immunohistochemical staining of the xenograft tumor sections. (F) mRNA levels of MMP2 and MMP9. RT-qPCR was performed in xenograft tumor tissues. (G) Expression levels of GnRHR in LNCaP, PC-3 cells and N87 cells. (H) Tumor growth of N87 cells-implanted xenografts. 30 mg/kg GV1001 showed no inhibitory effect on N87-tumor growth. Data represent means  $\pm$  SD (n=6, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control group).



#### 1-4. GV1001의 전립선암 세포 증식과 이동능 억제 효과

GnRH 유사체들의 반복 투여는 생체 내에서 시상하부-뇌하수체-생식선 축의 탈감작을 일으켜 생식선에서의 테스토스테론 분비를 억제하고, 결과적으로 전립선암의 성장을 저해한다. 그러나 최근 연구결과에 따르면 다양한 암세포에서 세포막에 발현된 GnRH 수용체가 직접적으로 세포 성장을 조절할 수 있다고 제시된다. 생체 외 세포에 대한 GV1001의 역할을 탐구하기 위해 GV1001-FITC 복합체를 이용하여 형광 발현을 검사하였고, GV1001-FITC의 형광 발현이 세포막과 세포질에서 관찰되었다 (Fig. 5A). LNCaP 세포주의 세포 증식이 GV1001과 LA 처치에 의해 농도 의존적으로 억제되었으며 (Fig. 5B, C), 이러한 증식 억제 효과는 GnRH 수용체 결핍 LNCaP 세포주에서는 관찰되지 않았다 (Fig. 5D). 암세포의 이동능 증가는 종양의 다른 장기로의 전이를 촉진시킨다. GV1001 처치에 의한 LNCaP 세포주 이동능 변화를 관찰하기 위해, transwell 실험을 시행하였다. GV1001 처치는 LNCaP 세포의 collagen 막 침윤을 강력하게 억제하였으나 LA 처치에 의한 영향은 관찰되지 않았다 (Fig. 5E, F). AR-양성 전립선암 세포주인 LNCaP, AR-음성 전립선암 세포주인 PC-3 모두 세포막에서 GnRH 수용체를 발현하고 있기 때문에 (Fig. 5G), PC-3 세포주의 증식과 이동능 실험을 진행하였다. GV1001 처치에 의해 PC-3 세포의 증식이 억제되었고 (Fig. 5H), transwell 실험에서 이동능이 억제되는 것을 관찰하였다 (Fig. 5I). 이상의 결과는 GV1001이 세포막의 GnRH 수용체와 결합하여 세포질 내로 침투할 수 있으며, 전립선암 세포에 발현된 GnRH 수용체에 의해 세포의 증식과 이동능을 직접적으로 조절할 수 있음을 시사한다.

**A****B****C****D****E****F**

**G****H****I**

**Figure 5. Effects of GV1001 on cell proliferation and migration in PCa cells.** (A) Penetration of GV1001 in LNCaP cells. LNCaP cells were treated with 10  $\mu$ M FITC-labeled GV1001. (B, C) Effects of GV1001 (B) and LA (C) on cell proliferation of LNCaP cells. Data represent means  $\pm$  SD (n=6, \*P<0.05, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (D) GnRHR-mediated inhibition of LNCaP cell proliferation by GV1001. Cell proliferation was determined by IncuCyte ZOOM live-cell analysis system. (E, F) Effects of GV1001 (E) and LA (F) on cell migration. Data represent means  $\pm$  SD (n=12, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (G) Expression levels of GnRHR and AR in both AR-positive LNCaP cells and AR-negative PC-3 cells. Data represent means  $\pm$  SD from three independent experiments. \*P<0.05 versus LNCaP cells. (H) Effect of GV1001 on cell proliferation of PC-3 cells. (I) Effect of GV1001 on cell migration of PC-3 cells.

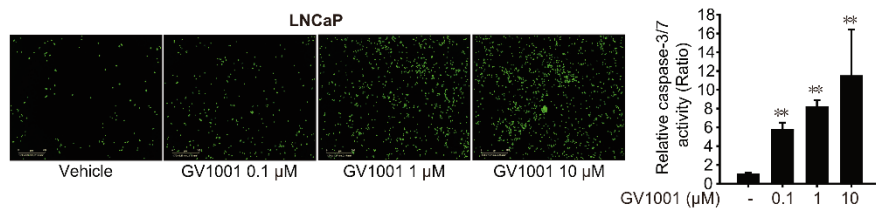
### 1-5. GV1001에 의한 세포자가사멸 유도 효과

GV1001에 의한 세포 증식 억제 효과가 세포자가사멸 억제 효과에 기인하는지 관찰하고자 세포자가사멸 유도 효소인 caspase-3/7 활성 평가를 시행하였다. LNCaP 세포주에 GV1001을 처리하였을 때, caspase-3/7 활성이 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 6A). 대표적인 GnRH 유사체인 LA와 CA와 동일 농도에서 비교하였을 때 GV1001은 caspase-3/7 활성의 증가가 더 크게 관찰되었다 (Fig. 6B). LNCaP 세포주에서 세포자가사멸에 동반되는 단백질 변화를 western blot 분석을 통해 확인하였고, GV1001 처리에 의해 세포자가사멸의 지표인 PARP1과 caspase-3의 단백질 절단이 관찰되었다 (Fig. 6C). 또한 미토콘드리아 내 세포자가사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현이 GV1001 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6C). 안드로겐 수용체 음성 전립선암 세포주인 PC-3 세포에서도 GV1001 처리에 의한 세포자가사멸 유도 효과가 동일하게 관찰되었다 (Fig. 6D, E). GV1001에 의해 유도되는 전립선암 세포주의 세포자가사멸효과가 세포내 발현된 GnRH 수용체를 경유하는지 평가하고자 GnRH 수용체 결핍 LNCaP 세포주에서 GV1001 처리 후 caspase-3/7 활성을 정량하였고, GnRH 수용체 siRNA가 도입된 LNCaP 세포주에서 caspase-3/7 활성 증가가 관찰되지 않았다 (Fig. 6F). 이어서, GV1001이 생체 내 LNCaP 세포에서 발현된 GnRH 수용체에 작용하는지 시험하고자 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 GnRH 수용체가 편집된 LNCaP 세포주를 구축하였다 (Fig. 6G). 대조군 LNCaP 세포주 와 GnRH 수용체 편집 LNCaP 세포주를 각각 누드 마우스에 이종 이식한 후 GV1001(10 mg/kg, 매일 투여, 피하 주사, 2주간 투여)을 투여하였을 때, 대조군 LNCaP 종양의 크기는

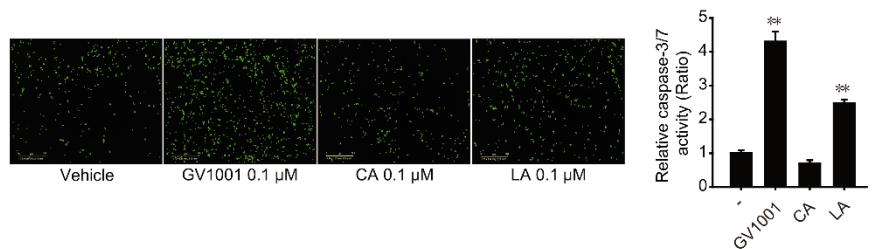
GV1001 투여에 의해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 6H). 그러나, GnRH 수용체 편집 LNCaP 종양의 크기는 GV1001 투여에 의해 유의미하게 감소하지 않았으며, 미미한 감소 효과를 보였다 ( $P=0.382$ )(Fig. 6H). 이러한 결과는 GV1001의 항암 효과가 뇌하수체 호르몬 분비 세포와 전립선암 세포에 발현되는 GnRH 수용체 모두에 의존적임을 시사한다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, GV1001은 전립선암 세포에 발현된 GnRH 수용체를 매개하여 세포자가사멸을 유도하고 세포 증식과 침윤을 직접적으로 억제할 수 있으며, 생체 내에서 전립선 종양의 성장과 진행을 억제할 수 있는 신규 GnRH 유사체임을 제시할 수 있다.

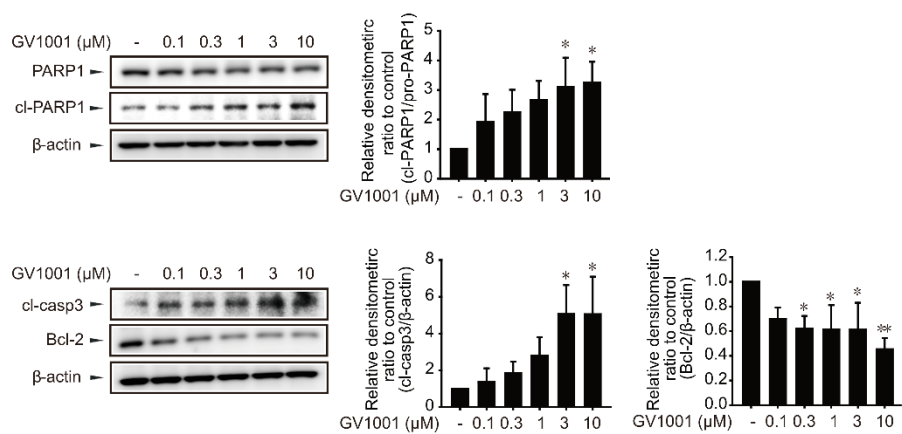
**A**

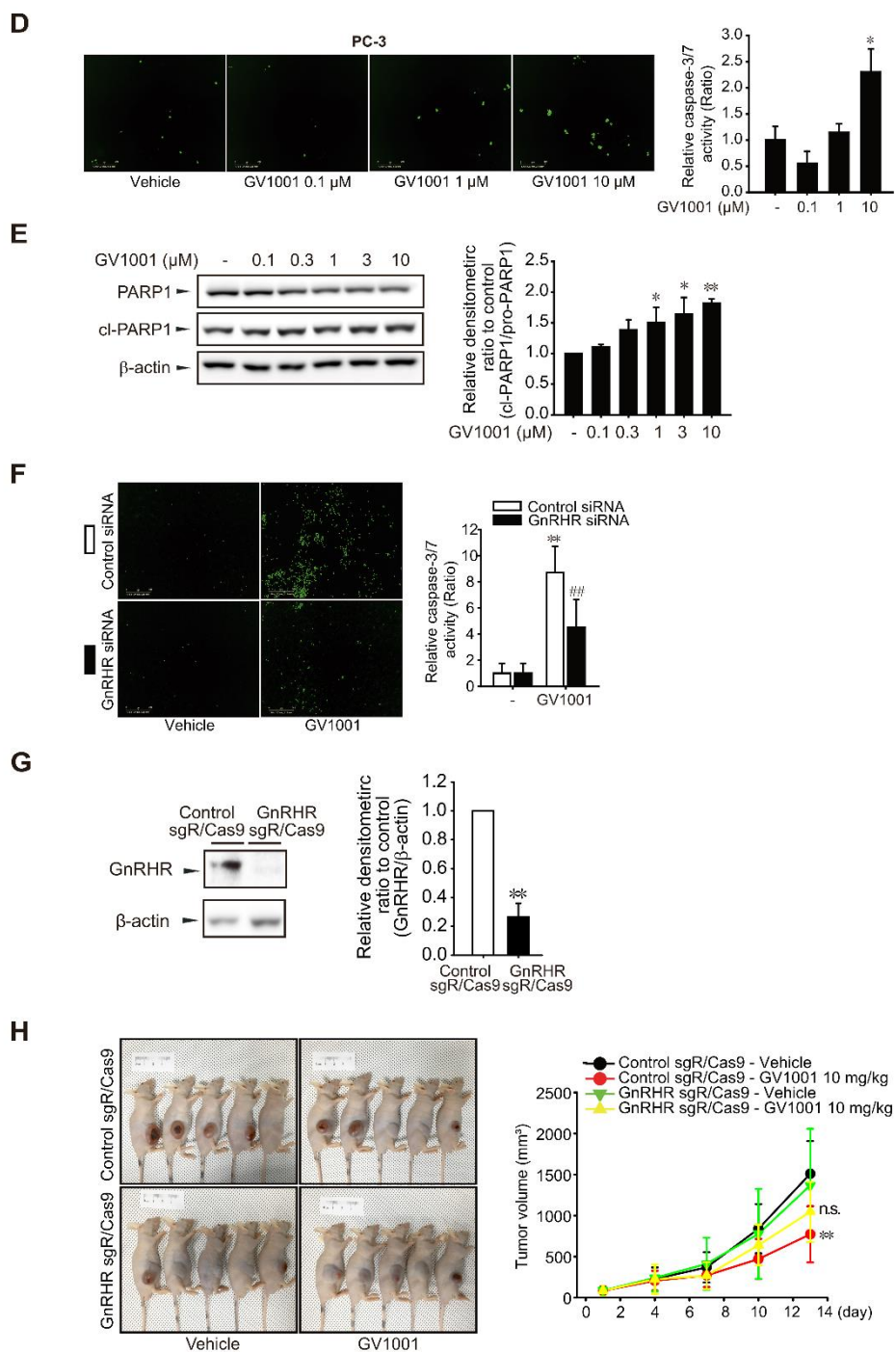


**B**



**C**







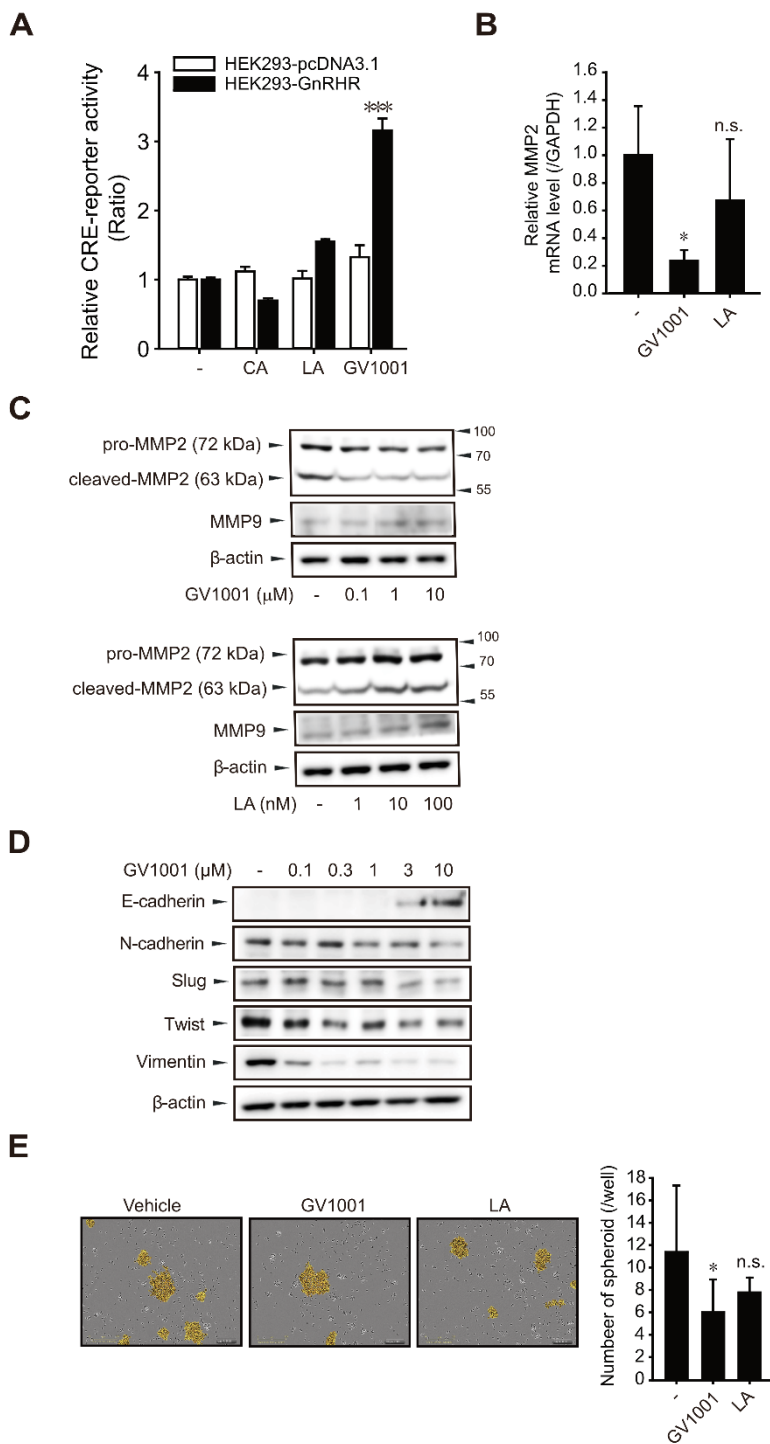
**Figure 6. GnRHR-dependent apoptosis induction by GV1001.** (A) Concentration-dependent effect of GV1001 on caspase-3/7 activity in LNCaP cells. LNCaP cells were exposed to GV1001 (0.1, 1, and 10  $\mu$ M) for 72 h and caspase-3/7 activity was determined by IncuCyte zoom system. Data represent means  $\pm$  SD (n=6, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (B) Comparison of apoptosis activity in GV1001-, CA- and LA-treated LNCaP cells. (C) Determination of apoptosis marker proteins in LNCaP cells. LNCaP cells were incubated with or without GV1001 (0.1-10  $\mu$ M) for 72 h. (D) Concentration-dependent effect of GV1001 on caspase-3/7 activity in PC-3 cells. (E) Determination of cl-PARP1 in PC-3 cells. (F) Effect of GnRHR siRNA on caspase-3/7 activity. Control siRNA or GnRHR siRNA-transfected LNCaP cells were exposed to 10  $\mu$ M GV1001 for 72 h and caspase-3/7 activity was determined by IncuCyte ZOOM system. (G) Protein levels of GnRHR in LNCaP-Control sgR/Cas9 and LNCaP-GnRHR sgR/Cas9 cells. Data represent means  $\pm$  SD (n=4, \*P<0.05 versus LNCaP-Control sgR/Cas9 cells). (H) Tumor growth of LNCaP-Control sgR/Cas9- or LNCaP-GnRHR sgR/Cas9-implanted xenografts. Left panel, representative images of tumor-bearing mice injected with or without GV1001 (10 mg/kg) for 13 days; Right panel, time-dependent changes in tumor volume. Data represent means  $\pm$  SD (n=5, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control group).

## 2) 전립선암 악성화에 따른 전이 기전 및 치료적 타겟 제시

### 2-1. 전립선암 세포의 상피간엽전환(EMT) 및 전이 억제 효과

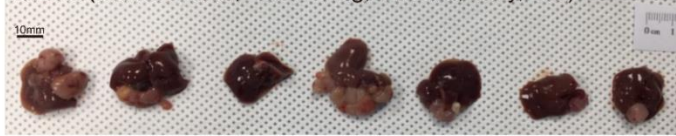
앞서 확인한 바와 같이 GV1001 처치에 의해 GnRH 수용체 과발현 HEK293 세포주에서 cAMP 신호에 의한 프로모터 활성이 증가하였고 (Fig. 7A), LNCaP 세포주에서 GV1001 처치에 의해 MMP2의 mRNA 수준이 감소하였다 (Fig. 7B). 이러한 효과는 LA 처치에 의해서 관찰되지 않았다 (Fig. 7A, B). Western blot 실험을 통해 MMP2와 MMP9의 단백질을 확인한 결과, LNCaP 세포주에서 GV1001 처치에 의해서 MMP2의 단백질 절단이 증가하였다 (Fig. 7C). 상피간엽전환(epithelial-mesenchymal transition, EMT)은 세포가 상피성 표현형을 상실하고 이동성이 높은 간엽성 표현형으로 전환되는 현상으로 암세포의 침윤과 전이에 크게 관여하는 것으로 알려져 있다. GV1001의 cAMP 선택적 신호 전달이 LA와 비교하여 유의적인 전이 억제를 유도할 것으로 예상하여 상피-간엽 전환에 관여하는 인자들의 단백질을 확인하였고, GV1001의 농도별 처치에 의해 LNCaP 세포주에서 발현되는 상피성 인자의 회복과 간엽성 인자의 억제가 관찰되었다 (Fig. 7D). 간엽성 표현형으로 전환된 암세포는 세포간의 3차원 구(spheroid)를 형성하여 줄기세포-유사 성질을 띄며 암 전이를 촉진한다. Ultra-low attachment surface plate 배양 조건에서 구 형성능을 측정한 결과, LNCaP 세포주에 GV1001을 처치하였을 때 구 형성이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 7E). GV1001이 생체 내에서 다른 장기로의 전립선암 전이를 억제할 수 있는지 평가하고자 누드마우스의 비장-간 전이 모델을 구축하였고, GV1001의 투여 (10 mg/kg, 매일 투여, 피하 주사, 4주간 투여)에 의해 간으로 전이되는 LNCaP 전립선 종양의 면적과 전이 발생

빈도가 감소하였다 (Fig. 7F-H). 이러한 결과는 GV1001이 전립선암 세포 내 전이 신호를 선택적으로 억제하고 상피-간엽 전환을 억제함으로써 생체 내 암 전이를 억제할 수 있다는 것을 의미한다.



**F**

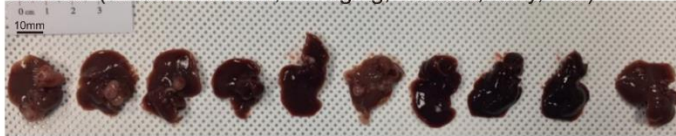
Vehicle (steriled water, 100 ml/20g, 4weeks, daily, s.c.)



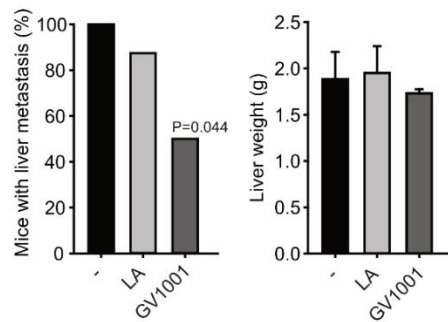
LA (diluted with S.W, 0.1 mg/kg, 4weeks, daily, s.c.)



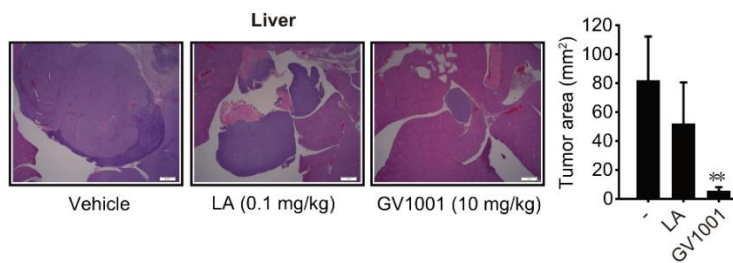
GV1001 (diluted with S.W, 10 mg/kg, 4weeks, daily, s.c.)



**G**



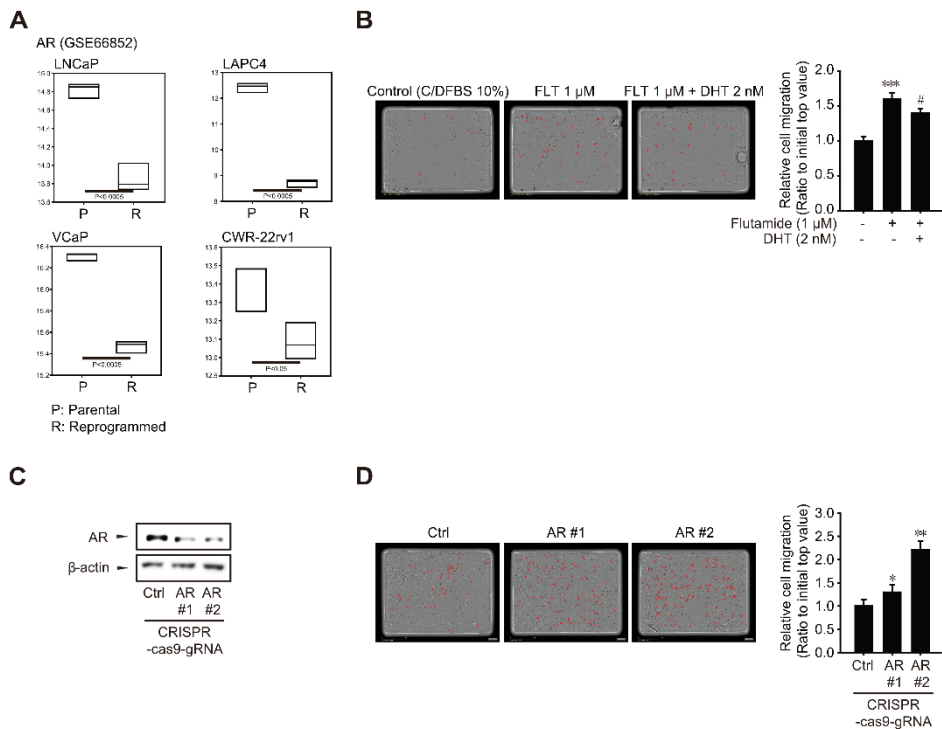
**H**



**Figure 7. Effects of GV1001 on PCa-tumor metastasis.** (A) Effects of CA, LA and GV1001 on CRE-luciferase activity in HEK293-pcDNA3.1(+) and HEK293-GnRHR cells. The cells were exposed to CA (100 nM), LA (100 nM) or GV1001 (10  $\mu$ M) for 24 h. Data represent means  $\pm$  SD (n=6, \*\*\*P<0.005 versus vehicle-treated control). (B) mRNA levels of MMP2. RT-qPCR was performed in LNCaP cells with LA (100 nM) or GV1001 (10  $\mu$ M) for 24h. (C) Determination of MMP2, MMP9 proteins in LNCaP cells. LNCaP cells were incubated with or without GV1001 (0.1-10  $\mu$ M) or LA (1-100 nM) for 24 h. (D) Determination of EMT-related proteins in LNCaP cells. LNCaP cells were incubated with or without GV1001 (0.1-10  $\mu$ M) for 24 h. (E) Effect of GV1001 or LA on LNCaP spheroid formation. LNCaP cells were seeded in 96-well ULA plate and treated with LA (100 nM) or GV1001 (10  $\mu$ M) for 96 hr. Data represent means  $\pm$  SD (n=4, \*P<0.05 versus vehicle-treated control). (F-H) Spleen-liver metastasis of LNCaP cells-implanted xenografts. After injection, the mice were divided into 3 groups (n=7-10) and treated with vehicle (PBS, daily, s.c.), GV1001 (10 mg/kg, daily, s.c.) or LA (0.1 mg/kg, daily, s.c.). Data represent means  $\pm$  SD (n=7-10, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (F) Representative pictures of the metastatic liver tumors from each group are shown. (G) Statistical analysis of the incidence of liver metastatic colonization. (H) Histological staining of the metastasized-liver section (H&E staining).

## 2-2. 전립선암 세포에서 AR의 세포 이동능 조절

세포 표현형 전환에 따른 AR의 발현 변화를 알아보하고자 4가지 서로 다른 전립선암 세포주의 마이크로어레이데이터(GSE66852)를 분석하였다. 전립선암 세포주에 줄기세포-유도 배양액을 처리하여 세포 표현형 전환을 유도하였을 때, AR의 발현은 모두 유의적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 8A). 기존의 연구에서 안드로겐 결핍이나 AR 활성화 저하는 전립선암 세포의 이동능을 촉진시켰으므로 transwell 실험을 진행하여 세포 이동능을 평가하였다. AR 길항제인 flutamide의 처리에 의해 LNCaP 세포의 이동능은 증가하였고, AR 작용제인 디하이드로테스토스테론(DHT, dihydrotestosterone)의 처리에 의해 세포의 이동능이 감소하였다 (Fig. 8B). LNCaP 세포주에 CRISPR-cas9-gRNA를 도입하여 AR의 DNA를 편집하였고 AR 유전자의 발현을 결핍시켰다 (Fig. 8C). AR 편집 LNCaP 세포의 이동능이 대조군 LNCaP 세포에 비하여 증가하였다 (Fig. 8D). 이상의 결과들은 AR의 발현과 활성화가 LNCaP 전립선암 세포주의 이동능을 조절하고 있음을 시사한다.

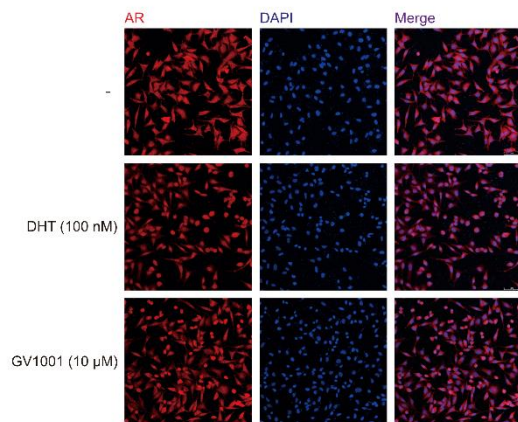
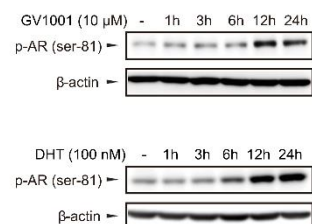
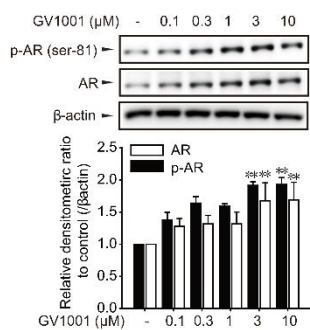
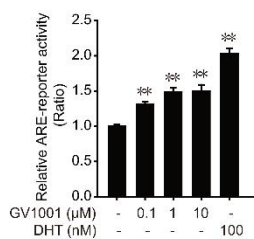
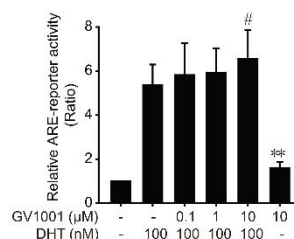
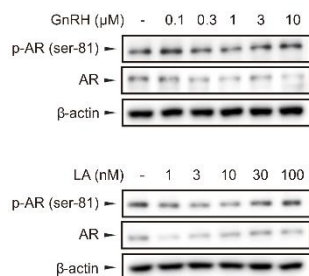
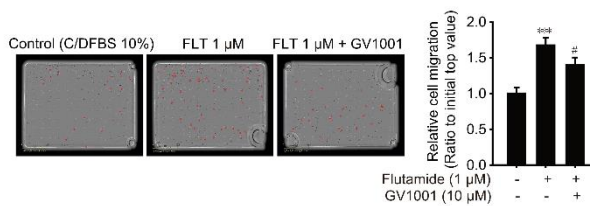


**Figure 8. Regulation of AR in PCa migration model *in vitro*.** (A) Gene expression of AR in therapy-induced developmental reprogrammed-PCa cells (n=3) as compared to parental PCa cell lines (GSE66852). Data were shown as box and whisker plot. Box, interquartile range (IQR); whiskers, 5–95 percentiles; and horizontal line within box, median. (B) AR-mediated inhibition of LNCaP cell migration with the treatment of DHT (2 nM). Migratory cell numbers were determined by IncuCyte ZOOM live-cell analysis system. Data represent means  $\pm$  SD (\*\*P<0.005 versus vehicle-treated control, #P<0.05 versus flutamide-treated group). (C) Silencing of AR by CRISPR-cas9-gRNA. Expression of AR was determined by immunoblottings. (D) AR silencing-induced increase of LNCaP cell migration.



### 2-3. 전립선암 세포에서 GV1001의 AR 활성화 조절

AR의 조절이 GV1001의 전립선암 세포주에 대한 효과를 매개하는지 확인하기 위해, LNCaP 세포주에 GV1001을 처리한 후 AR의 활성화를 형광현미경을 통해 관찰하였다. DHT를 처리하였을 때와 마찬가지로 GV1001을 처리하였을 때 AR이 활성화 되어 핵 내로 이동한 것을 확인하였다 (Fig. 9A). AR은 세포질에서 인산화되어 핵 내로 이동하므로, LNCaP 세포주에 각각 DHT와 GV1001을 처리하여 24시간 이내에 인산화 되는 것을 western blot 실험을 통해 확인하였다 (Fig. 9B). 또한, GV1001의 농도 의존적 AR 인산화를 확인하였고 (Fig. 9C), androgen-response element(ARE)-luciferase construct를 도입하여 프로모터 활성을 측정하였을 때에도 GV1001의 농도 의존적인 프로모터 활성화가 관찰되었다 (Fig. 9D). AR 내인성 작용제인 DHT와 GV1001을 병용 처리하였을 때에 DHT에 의한 프로모터 활성화와 상가적인 활성 증가가 관찰되었다 (Fig. 9E). 앞서 GV1001은 GnRH 수용체에 작용하여  $G\alpha s$ -cAMP 신호를 선택적으로 증폭시키는 것을 규명하였으므로, GnRH 수용체의 대표적인 리간드인 GnRH와 LA를 다양한 농도로 처리하였으나 GnRH와 LA에 의한 AR 활성화는 관찰되지 않았다 (Fig. 9F). 결과적으로 GV1001은 AR 활성화와 함께 flutamide 처리에 의해 증가된 LNCaP 세포 이동능을 억제하는 것을 확인하였다 (Fig. 9G).

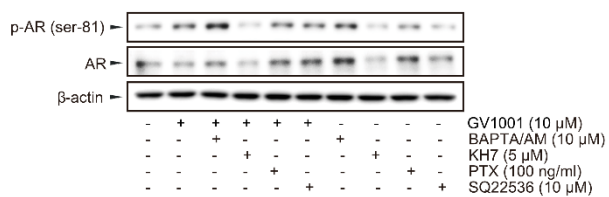
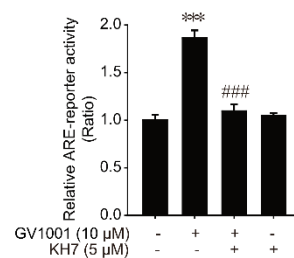
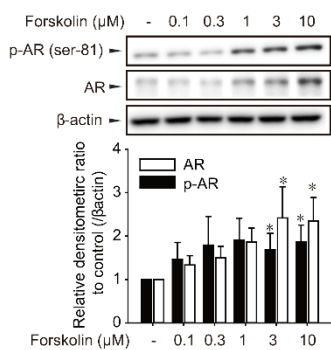
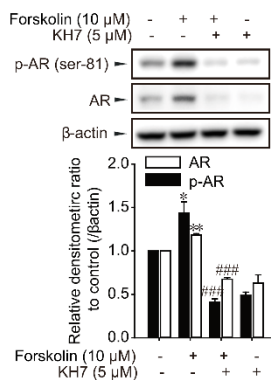
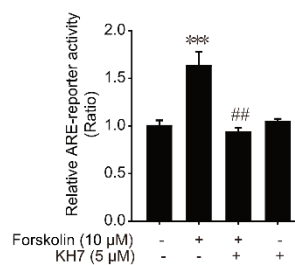
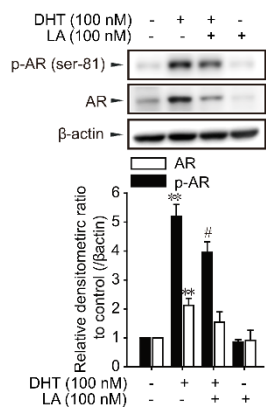
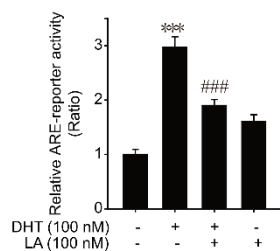
**A****B****C****D****E****F****G**

**Figure 9. Activation of AR by GV1001 in PCa cells.** (A) Confocal images of AR in LNCaP cells treated with DHT (100 nM) or GV1001 (10  $\mu$ M) for 24 h. (B) Immunoblottings of AR phosphorylation in LNCaP cells treated with DHT (100 nM) or GV1001 (10  $\mu$ M) in a time-dependent manner. (C) Immunoblottings of AR expression and AR phosphorylation in LNCaP cells treated with GV1001 (0.1-10  $\mu$ M). (D) Effects of GV1001 on ARE-luciferase activity in LNCaP cells. LNCaP cells were transiently transfected with ARE-luciferase plasmid (1  $\mu$ g/ml) and the cells were exposed to DHT (100 nM) or GV1001 (0.01-10  $\mu$ M) for 24 h. Data represent means  $\pm$  SD (n=6, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (E) GV1001-mediated functional additive increase on DHT-induced increase in ARE-luciferase activity (n=8). (F) Immunoblottings of AR expression and AR phosphorylation in LNCaP cells treated with GnRH (0.1-10  $\mu$ M) or LA (1-100 nM). (G) AR-mediated inhibition of LNCaP cell migration by GV1001 (10  $\mu$ M).

## 2-4. GV1001의 AR 활성화 신호 조절

AR의 활성화가 GV1001의 선택적 신호 전달에 의해 조절되는 지 알아보하고자 다양한 G-단백질 하위 신호의 저해제를 도입하여 GV1001에 의한 AR 활성화에 관여하는 G-단백질 신호를 도출하고자 하였다. LNCaP 세포에서 GV1001 처치에 의해 증가한 AR의 인산화는  $G\alpha s$ -cAMP 신호 전달에 필수적인 *adenylyl cyclase* 저해제인 KH7 처치에 의해 현저히 억제되었다 (Fig. 10A). 그러나  $G\alpha q$ -세포내 칼슘 저장을 억제하는 BAPTA/AM 처치에 의해서는 상가적 증가가 관찰되었다 (Fig. 10A). 또한 GV1001에 의해 증가되는 ARE 전사활성이 KH7의 처치에 의해 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 10B).  $G\alpha s$ -cAMP 신호에 의한 직접적인 AR 인산화가 관찰되는지 LNCaP 세포에서 western blot 실험을 진행하였고, cAMP 활성화제인 forskolin을 처치하였을 때 AR의 활성화가 농도 의존적으로 관찰되었다 (Fig. 10C). 또한, Forskolin과 함께 KH7을 처치하였을 때, forskolin에 의해 증가된 AR 인산화가 억제되었다 (Fig. 10D). LNCaP 세포의 ARE의 리포터 활성이 forskolin 처치에 의해 증가하였고, KH7의 처치에 의해 억제되었다 (Fig. 10E). 앞서 BAPTA/AM의 처치에 의해 AR의 인산화가 GV1001과 상가적으로 증가되었을 뿐 만 아니라, BAPTA/AM 단독 처치에 의해서도 증가하였기 때문에(Fig. 10A),  $G\alpha q$ -칼슘 신호에 의해 AR 인산화가 저해되는지 관찰해보고자 하였다. LNCaP 세포주에 AR의 내인성 활성화제인 DHT와  $G\alpha q$  신호 활성화제인 LA를 처치하였을 때, DHT에 의해 증가한 AR의 인산화가 LA 처치에 의해 억제되었다 (Fig. 10F). 또한, DHT 처치에 의해 증가한 LNCaP 세포의 ARE 리포터 활성이 LA의 처치에 의해

억제되었다 (Fig. 10E). 이러한 결과들은 GV1001의  $G\alpha s$ -cAMP 신호 선택적 활성화가 AR의 인산화를 촉진하고, LA의  $G\alpha q$ -칼슘 신호 활성화가 AR의 인산화를 억제함으로써 AR 하위 유전자들의 발현을 조절하고, 세포 이동능에 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다.

**A****B****C****D****E****F****G**

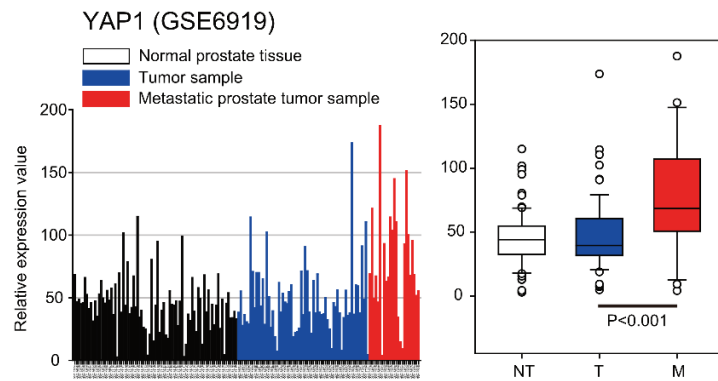
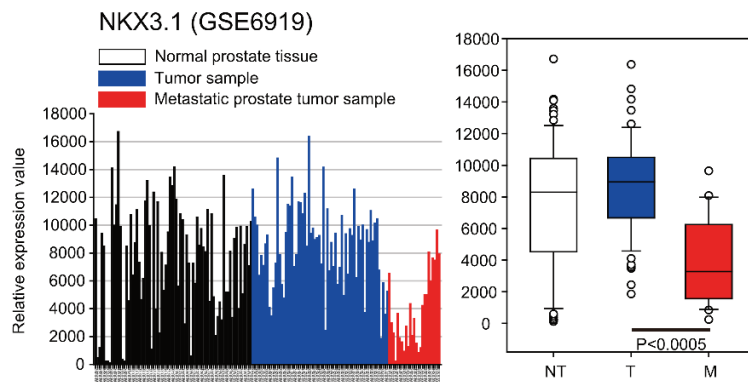
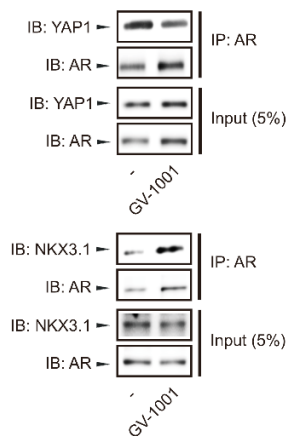
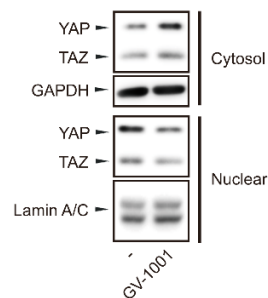
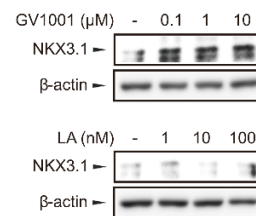
**Figure 10. Gas-cAMP pathway-dependent activation of AR by GV1001.** (A) Immunoblottings of AR expression and AR phosphorylation in LNCaP cells treated with GV1001 (10  $\mu$ M) and calcium chelator BAPTA/AM (10  $\mu$ M), soluble adenylyl cyclase inhibitor KH7 (5  $\mu$ M), G $\alpha$ i inhibitor pertussis toxin (PTX, 100 ng/ml), transmembrane adenylyl cyclase inhibitor SQ22536 (10  $\mu$ M). (B) Inhibitory effect of KH7 on GV1001-induced ARE-luciferase activity in LNCaP cells. LNCaP cells were transiently transfected with ARE-luciferase plasmid (1  $\mu$ g/ml) and the cells were exposed to KH7 (5  $\mu$ M) and GV1001 (10  $\mu$ M) for 24 h. Data represent means  $\pm$  SD (n=5, \*\*\*P<0.005 versus vehicle-treated control, ###P<0.005 versus GV1001-treated group). (C) Immunoblottings of AR expression and AR phosphorylation in LNCaP cells treated with forskolin, a cAMP activator (0.1-10  $\mu$ M). Data represent means  $\pm$  SD (n=3, \*P<0.05 versus vehicle-treated control. (D) Inhibitory effect of KH7 on forskolin-induced AR expression and AR phosphorylation in LNCaP cells. (E) Inhibitory effect of KH7 on forskolin-induced ARE-luciferase activity in LNCaP cells. (F, G) Regulation of DHT-induced AR activation by G $\alpha$ q activator, LA (100 nM). (F) Inhibitory effect of LA on DHT-induced AR phosphorylation in LNCaP cells. (G) Inhibitory effect of LA on DHT-induced ARE-reporter activity in LNCaP cells.

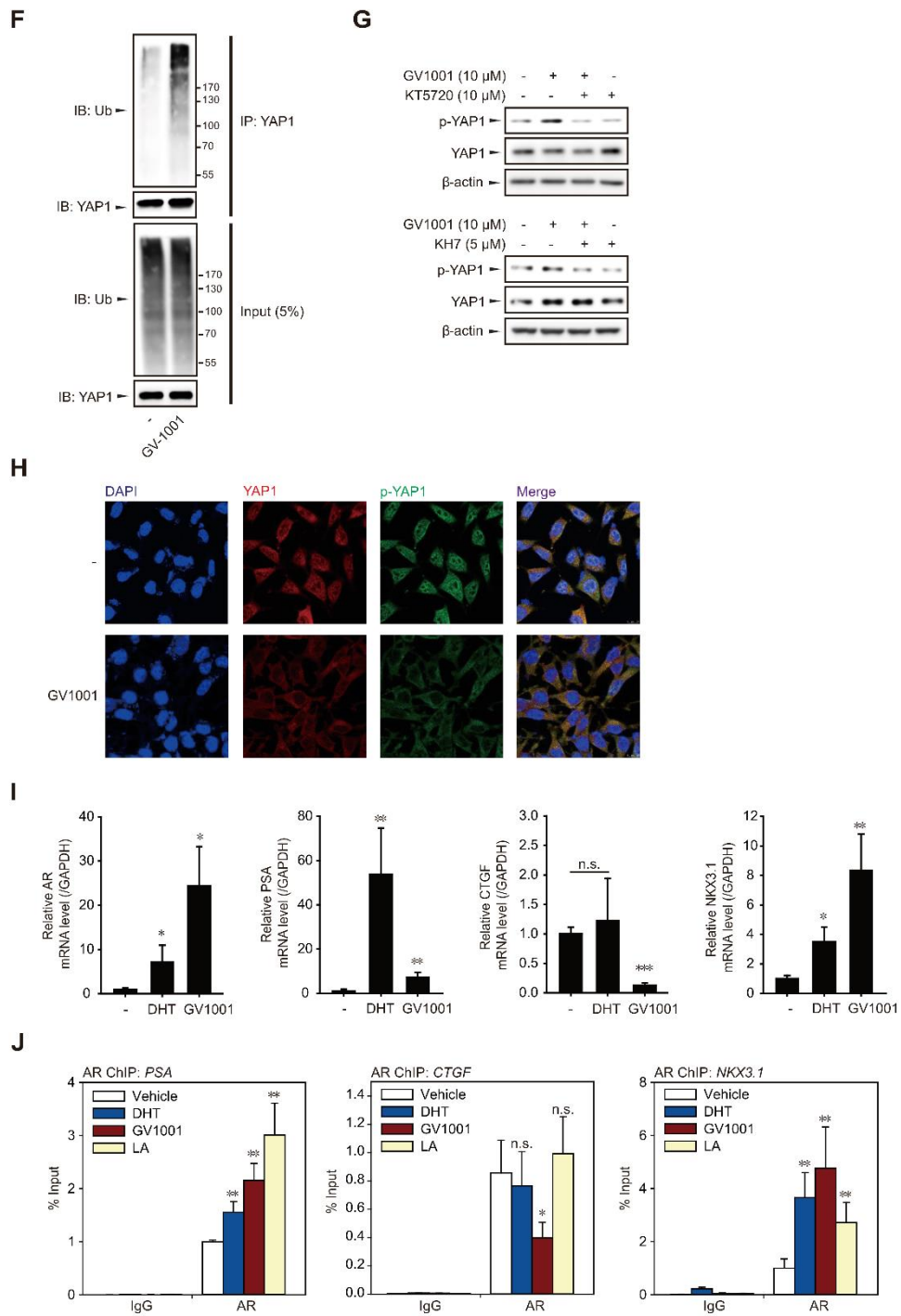
## 2-5. 전립선암에서 AR 보조조절자 YAP1의 활성화

Hippo pathway의 비정상적인 조절로 인해 증가된 전사 인자 YAP1은 핵 내로 들어가 다양한 발암원성 유전자들의 발현을 촉진한다(Janse van Rensburg and Yang, 2016). 전립선암의 악성화에 따른 전이 진행 중 유전자 발현 변화를 알아보고자 전립선암 환자의 정상 전립선조직 및 암조직, 전이 전립선암 조직의 마이크로어레이데이터(GSE6919)를 분석하였다. 정상 전립선조직에 비해 전립선암 조직 및 전이 조직에서 YAP1의 발현이 증가해 있는 것을 관찰하였다 (Fig. 11A). NKX3.1의 발현은 대조군에 비해 전립선암 조직 및 전이 조직에서 현저히 감소된 것을 확인하였다 (Fig. 11B). YAP1과 NKX3.1은 AR의 보조조절자로서, AR과 결합하여 AR의 하위 신호전달 및 타겟 유전자의 발현을 조절한다. GV1001의 AR 활성화와 전이 억제 과정에 YAP1과 NKX3.1이 관여하고 있는지 확인하기 위해 면역침강법을 진행하였고, LNCaP 세포주에 GV1001 처리 후 AR과 결합하는 YAP1의 단백질 수준이 감소함을 확인하였다 (Fig. 11C). AR과 NKX3.1의 결합은 GV1001 처리에 의해 증가함을 확인하였다 (Fig. 11C). 또한, LNCaP 세포주에서 GV1001 처리에 의한 YAP1의 세포질 내 정체와 핵 내 발현 감소를 확인하였다 (Fig. 11D). Western blot 실험을 통해 LNCaP 세포에서 GV1001을 처리하였을 때 NKX3.1의 발현이 증가하는 것을 관찰하였으며 이러한 결과는 LA를 처리하였을 때 관찰되지 않았다 (Fig. 11E). YAP1은 hippo pathway의 활성화에 의해 인산화되어 세포질에 축적되고 유비퀴틴-단백분해효소에 의해 분해된다. YAP1이 GV1001 처리에 의해 유비퀴틴화 되는지 면역침강법을 수행하였고, LNCaP 세포에서 GV1001의 처리는 YAP1의



유비퀴틴화를 촉진하였다 (Fig. 11F). GV1001에 의해 인산화된 YAP1은 또한 앞서 확인한 *Gαs*-cAMP 신호의 저해제인 KT5720과 KH7의 처치에 의해 억제되었다 (Fig. 11G). GV1001의 처치에 의해 세포질 내 정체되는 YAP1과 인산화 YAP1을 면역형광 검사를 통해 관찰하였다 (Fig. 11H). AR의 활성화에 동반되는 YAP1의 불활성화가 GV1001에 의해 관찰되었기 때문에, AR의 타겟 유전자들의 전사적 발현을 qPCR을 통해 분석하였다. DHT에 의해 증가되는 AR, PSA, NKX3.1의 mRNA 발현 수준은 GV1001에 의해 증가되는 것을 관찰하였고, YAP1의 대표적인 타겟 유전자인 CTGF의 mRNA 발현은 GV1001에 의해 유의미하게 억제되는 것을 관찰하였다 (Fig. 11I). 약물 처치에 의해 변화되는 프로모터 결합능을 확인하여 AR 타겟 유전자에 대한 전사 조절을 평가하고자 염색질면역침강 실험을 진행하였다. GV1001 처치에 의해 AR 단백질과 AR 타겟 유전자인 PSA의 프로모터 결합능이 증가하였고, NKX3.1의 프로모터 결합능이 DHT를 처치하였을 때 보다 증가하였다 (Fig. 11J). AR 단백질과 YAP1 타겟 유전자인 CTGF의 프로모터 결합능은 GV1001을 처치하였을 때 유의하게 감소하였다 (Fig. 11J). 이상의 결과를 종합하면, GV1001이 AR 활성화와 함께 보조조절자인 NKX3.1의 발현 및 AR과의 결합을 증가시키고 YAP1의 활성화 및 AR과의 결합을 저해하며, 보조조절자 선택적으로 AR 타겟 유전자들의 발현을 조절한다는 것을 시사한다.

**A****B****C****D****E**



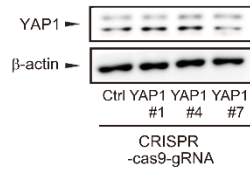
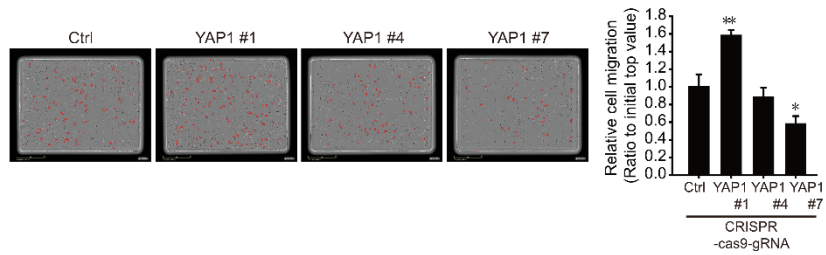
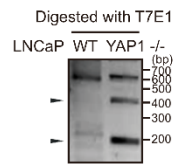
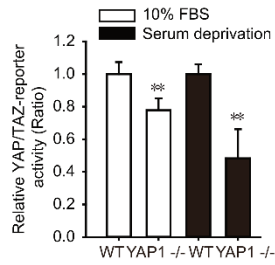
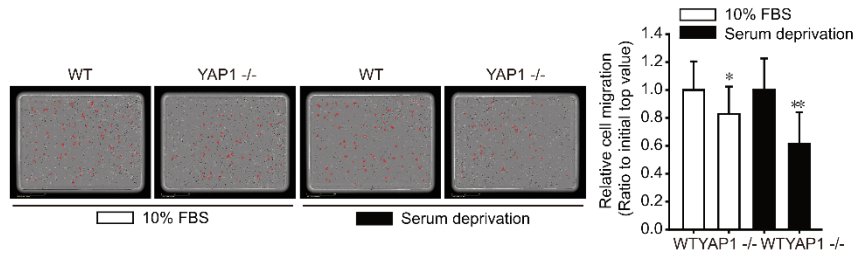
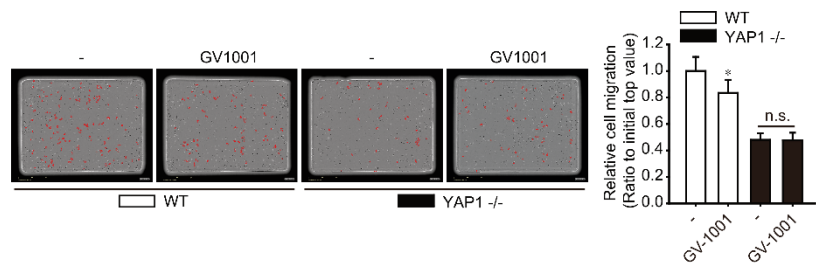
**Figure 11. Inactivation of YAP1 and AR-coregulator switch by GV1001.** (A, B)

Gene expressions of AR coregulators increased or decreased by prostate cancer metastatic process. YAP1(A) and NKX3.1(B) expressions in primary prostate tumor tissues, metastatic prostate tumor tissues or normal prostate tissues of prostate cancer patients (n=164)(GSE6919). Data were shown as box and whisker plot. Box, interquartile range (IQR); whiskers, 5–95 percentiles; and horizontal line within box, median. (C) IP and immunoblottings of AR and YAP1 proteins in LNCaP cells treated with GV1001 (10  $\mu$ M) for 24 h. (D) YAP and TAZ proteins in cytoplasmic and nuclear fractions obtained from LNCaP cells that treated with GV1001 (10  $\mu$ M) for 24 h. (E) Immunoblottings of NKX3.1 in LNCaP cells treated with GV1001 (0.1–10  $\mu$ M) or LA (1–100 nM). (F) Induction of ubiquitination by GV1001. LNCaP cell lysates were immunoprecipitated with YAP1 antibody and analyzed by immunoblottings with anti-Ub antibody to capture polyubiquitinated YAP1. (G) Inhibitory effect of KT5720 (upper) and KH7 (lower) on GV1001-induced YAP1 phosphorylation in LNCaP cells. (H) Co-immunofluorescence (co-IF) analysis of YAP1 and phospho-YAP1 proteins in LNCaP cells that were treated with GV1001 (10  $\mu$ M) for 4 h. Alexa Fluor 568 stained YAP1 (red), Alexa Fluor 488 stained phospho-YAP1 (green) and DAPI stained cell nuclei (blue). Magnification: 60X. Micrographs are the representation of multiple confocal images. (I) mRNA levels of AR and YAP1 target gene. RT-qPCR was performed in LNCaP cells treated with DHT (100 nM) or GV1001 (10  $\mu$ M) for 24 h. (J) ChIP-qPCR analysis in LNCaP cells of AR recruitment to PSA, CTGF, NKX3.1 promoter after treatment of DHT (100 nM), GV1001 (10  $\mu$ M) or LA (100 nM).

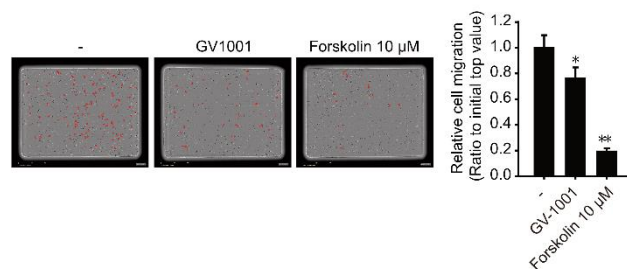
## 2-6. YAP1 활성화 조절에 의한 세포 이동능 조절 효과

GV1001의 AR 보조조절자인 YAP1과 NKX3.1에 대한 활성화 조절 효과가 전립선암 세포의 이동능을 매개하고 있는지 확인해보고자 LNCaP 세포주에 CRISPR-cas9-gRNA를 도입하여 YAP1의 DNA를 편집하였고 #7 colony의 YAP1 단백질 결핍을 western blot 실험을 통해 확인하였으나 단백질 발현이 억제되는 효과가 미비하였다 (Fig. 12A). Transwell 실험을 통한 세포 이동능 평가에서 #7 colony의 이동능 억제 효과가 관찰되었으며 (Fig. 12B), 더욱 명확한 DNA 편집을 확인하기 위한 방법으로 T7 endonuclease1(T7E1)을 이용하여 변이가 일어난 DNA 부위를 조각내어 탐지하는 T7E1 실험을 진행하였다. #7 colony의 621bp 길이의 YAP1 DNA 가닥에서 편집된 부분의 절단이 관찰되었다 (Fig. 12C). 세포 배양시 첨가되는 소태아혈청(FBS)은 세포 내 YAP1 발현을 억제하는 hippo 신호의 대표적인 활성 인자이다. FBS가 포함된 조건과 FBS가 결핍된 조건 모두에서 YAP1 결핍에 의해 YAP/TAZ-responsive 리포터 활성이 저해되었으며, 그 차이는 FBS 결핍 조건에서 현저히 크게 관찰되었다 (Fig. 12D). FBS 포함 배지와 FBS 결핍 배지를 이용하여 배양된 YAP1 결핍 LNCaP 세포는 각각의 대조군 세포에 비하여 감소된 이동능을 보였으며 (Fig. 12E), YAP1 결핍 LNCaP 세포에 GV1001을 처리하였을 때, GV1001에 의한 이동능 억제 효과가 관찰되지 않았다 (Fig. 12F). 이러한 YAP1 의존적 이동능이 GV1001 하위의 Gas-cAMP 신호에 의해 조절되는지 확인하기 위해 forskolin을 처리하였을 때, LNCaP 세포의 이동능이 현저하게 감소되었다 (Fig. 12G). 또한, 앞서 확인한 Gas-cAMP 신호의 저해제인 KT5720과 KH7의 처리에 의해

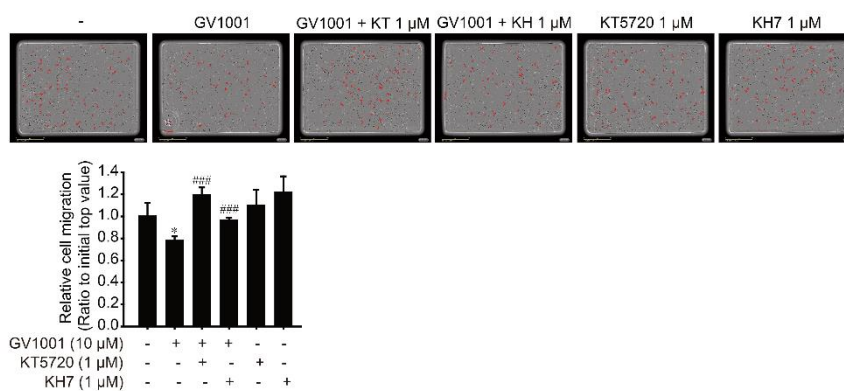
GV1001의 이동능 억제 효과가 역전되는 것을 관찰하였다 (Fig. 12H). 생체 내에서 YAP1이 전립선암의 진행에 미치는 영향을 알아보기 위하여 전립선암 이종이식 동물 모델을 사용하였다. YAP1 결핍된 LNCaP 세포주를 이식한 쥐에서 종양의 성장이 대조군에 비하여 억제된 것을 관찰하였다 (Fig. 12I). YAP1의 결핍이 LNCaP 세포주의 이동능 및 종양 성장에 억제 효과를 갖는 것을 확인하였으므로, 반대로 YAP1의 핵 내 이동을 유도하는 활성화 촉진 형태인 YAP5SA를 이용한 과발현 시스템을 구축하였다 (Fig. 12J). YAP1의 결핍 시에 관찰한 바와 같이, YAP5SA 과발현 LNCaP 세포주 역시 대조군 LNCaP 세포주와 단백질 발현의 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Fig. 12J). 그러나 YAP5SA 과발현 plasmid의 transfection을 Myc 단백질을 발현을 통해 관찰하였으며, YAP1의 대표적인 타겟 유전자인 CTGF의 과발현을 확인하였다 (Fig. 12J). 이와 같이 구축한 YAP5SA 과발현 LNCaP 세포주는 대조군 LNCaP 세포주와 비교하여 현저하게 증가된 세포 이동능을 보였다 (Fig. 12K). YAP5SA 과발현 LNCaP 세포주에 GV1001을 처리하였을 때, 대조군 LNCaP 세포주에서 관찰된 GV1001에 의한 세포 이동능 억제 효과가 관찰되지 않았다 (Fig. 12K). 종합하면, GV1001 하위의  $G\alpha s$ -cAMP 신호를 통해 조절된 YAP1 활성화는 전립선암 세포주의 이동능을 매개하고 있으며 이는 전립선암 진행과 전이를 비롯한 다양한 병리적 상황에서 중요한 역할을 담당하고 있을 것이라고 제시할 수 있다.

**A****B****C****D****E****F**

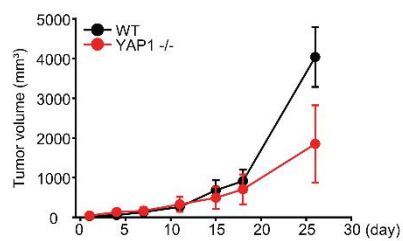
**G**



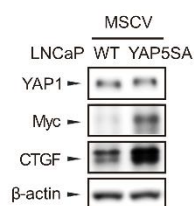
**H**



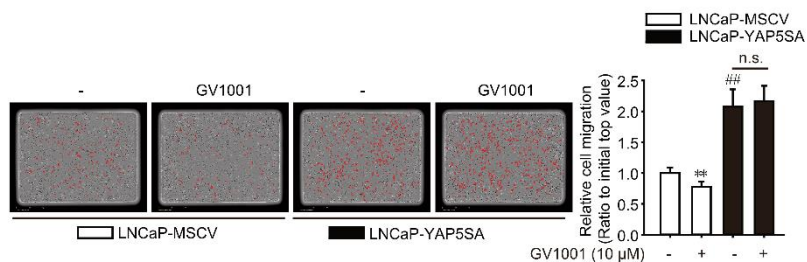
**I**



**J**



**K**





**Figure 12. Effects of YAP1 regulation on PCa *in vitro* migration and *in vivo* progression.** (A) Silencing of YAP1 by CRISPR-cas9-gRNA. Expression of YAP1 was determined by immunoblottings. (B) Inhibition of LNCaP cell migration by YAP1 knock-out. (C) Mutation verification of YAP1 with T7E1 digestion assay. In CRISPR-cas9-Ctrl transfected LNCaP cells, control band was positively detected. In CRISPR-cas9-YAP1 transfected YAP1 KO LNCaP cells (YAP1 #7), heteroduplex mutant DNA were detected. (D) LNCaP-WT and LNCaP-YAP1 KO cells were transiently transfected with YAP/TAZ-responsive promoter-luciferase plasmid (1  $\mu$ g/ml) and the cells were incubated with or without serum (10% FBS) for 24 h. Data represent means  $\pm$  SD (n=4, \*\*P<0.01 versus LNCaP-WT). (E) YAP1-mediated LNCaP cell migration. Migratory cell numbers were determined by IncuCyte ZOOM live-cell analysis system. Data represent means  $\pm$  SD (\*P<0.05, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control). (F) Effect of GV1001 on LNCaP cell migration via YAP1. (G) Gas/cAMP pathway-mediated inhibition of LNCaP cell migration. (H) Effect of GV1001 on LNCaP cell migration via Gas/cAMP pathway. (I) Tumor growth of LNCaP-WT and LNCaP-YAP KO cells-implanted xenografts. Time-dependent changes in tumor volume. Data represent means  $\pm$  SD (n=4, \*P<0.05 versus LNCaP-WT group). (J) Constitutive active form of YAP1. In MSCV-YAP5SA transfected LNCaP cells, Myc and CTGF were highly upregulated. (K) YAP1-upregulation increases LNCaP cell migration. Migratory cell numbers were determined by IncuCyte ZOOM live-cell analysis system. Data represent means  $\pm$  SD (\*P<0.05, \*\*P<0.01 versus vehicle-treated control).

## IV. 고 찰

전립선암은 남성에서 발병하는 암 중 발병율과 사망율이 가장 높은 암 중 하나이며(Jemal et al., 2011; Siegel et al., 2011), 전이가 매우 빠르게 진행된다는 점과 치료 요법이 제한적이라는 점 때문에 추가적인 치료 약제의 개발이 필요한 질병이다. 전립선암의 치료 약제로는 호르몬 요법이 고 위험군의 환자들에게 1차적으로 단독 혹은 다른 치료 요법과 병용 요법으로 사용된다(Akaza, 2011; Cornford et al., 2017). 그러나 투여 시작 후 12-18개월 이내에 전이를 동반하는 악성화가 빠르게 진행되며, 이는 전립선암으로 인한 사망의 주된 원인이 된다(Chi et al., 2009; Devlin and Mudryj, 2009; Harris et al., 2009; Lassi and Dawson, 2010).

GnRH 수용체는 전립선암 치료의 중요한 타겟으로, GnRH 유사체들을 반복 투여하면 시상하부-뇌하수체-생식선축의 GnRH 수용체 탈감작을 일으켜 생식선에서의 테스토스테론 분비가 억제된다(Jacobi and Wenderoth, 1982). GnRH 수용체는 GPCR의 일종으로, 세포 외부의 리간드와 결합하여 하위의 G-단백질을 활성화 시키고 세포 내로 신호를 전달한다(Hawes et al., 1993; Stanislaus et al., 1998). 뇌하수체 성선 자극 호르몬 세포에서 결합한 리간드에 의존적으로 GnRH 수용체가 하위의 적절한 G-단백질의 활성화를 일으키며 뉴런 기능 및 호르몬 분비 기능을 조절하는 것이 규명되어 있다(Grosse et al., 2000; Hille et al., 1994; Voliotis et al., 2018). 이러한 현상은 GnRH 수용체가 서로 다른 자극에 의해 각기 다른 효과를 유도하기 위해서, 다양한 G-단백질을 매개로 한다는 것을 의미한다. 또한 GnRH 와 GnRH 수용체 단백질은 뇌하수체

성선 자극 호르몬 세포뿐만 아니라, 정상 난소 상피 조직, 유방 조직, 전립선 조직과 유방암 세포주 (MCF-7, MDA-MB-468), 전립선암 세포주 (PC-3, LNCaP) 에서도 발견되는 것이 확인되어 있다(Bono et al., 2002; Borroni et al., 2000; Kakar et al., 1994; Kang et al., 2003). 이와 같이 암세포에 발견된 GnRH 수용체는 암세포의 성장에 직접 기여하고 있으며, GnRH 유사체들이 다양한 G-단백질을 조절함으로써 암세포의 진행에 직접적인 억제 효과를 갖는다는 것이 보고되어 있다. 자궁 내막 암(HEC-1A, Ishikawa) 및 난소 암(EFO-21, EFO-27) 세포에 발견된 GnRH 수용체가 GnRH 유사체와 결합하였을 때, 하위의 G $\alpha$ i-단백질을 경유하여 성장(Grundker et al., 2001; Imai et al., 1997; Imai et al., 1996; White et al., 2008) 및 분열 유도 신호전달(mitogenic signal transduction)(Emons et al., 1998)에 억제효과를 갖는 것이 관찰되었으며, 전립선암 세포주 (JEG-3, DU145, PC-3, LNCaP)에서 GnRH 유사체가 G $\alpha$ i-단백질을 활성화 시켜 세포자가사멸을 유도하는 것이 관찰되었다(Angelucci et al., 2004; Kraus et al., 2004; Kraus et al., 2006; Limonta et al., 1999; Maudsley et al., 2004). 또한, 안드로겐 비반응성 전립선암 세포주인 DU145를 이용한 이종 이식 동물모델에서 GnRH 유사체를 누드 마우스에 투여하였을 때 종양 성장이 억제되는 현상을 관찰하여, 생체 내에서 직접적인- 내분비계 호르몬 비반응성-항종양 효과를 추가적으로 증명하였다(Dondi et al., 1998). 이러한 결과들에 근거하여 암세포에 발견된 GnRH 수용체는 암 치료를 위한 새로운 수용체 표적화 전략의 후보로 간주된다.

GV1001은 항암 백신으로 접종시 암세포 내의 hTERT를 인지하는 여러 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T 세포에 의한 면역 반응을 촉진하여 암세포의 제거를

유도한다(Kyte, 2009). 최근 GV1001의 뛰어난 안전성을 바탕으로 췌장암, 비소세포성 폐암(NSCLC), 흑색종과 같은 다양한 암에서 GV1001의 접종이 면역반응을 촉진하고 면역 반응이 일어난 환자에서 생존기간을 증가시킨다는 것이 보고된 바 있다(Bernhardt et al., 2006).

본 연구에서 항암 백신인 GV1001의 전립선암에 대한 항암 작용의 분자적 기전을 탐구하기 위해 펩타이드의 구조 분석을 실시하였고, 그 결과 GV1001의 아미노산 서열 일부가 GnRH와 GnRH 작용제인 LA 및 GnRH 길항제인 CA와 중첩되는 것을 확인하였다. GnRH 펩타이드는 세포 외부에서 단백분해효소(proteolytic enzymes)에 의해 절단되는데(Cleverly and Wu, 2010; Peter et al., 1996; Yang et al., 1998), Trp<sup>3</sup>-Ser<sup>4</sup>와 Tyr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>의 결합이 절단되는 것으로 알려져 있다(Lasdun et al., 1989; Peter et al., 1996). 또한, Gly<sup>6</sup>의 치환은 펩타이드의 구조적 안정성을 높여주고, 수용체와의 결합능을 증가시키며, 대사적 청소율(metabolic clearance)을 낮추는 기능적 특성이 있기 때문에, GnRH 유사체를 합성할 시 이 아미노산의 치환을 가장 많이 시도한다(Sealfon et al., 1997). C-terminal의 에틸아마이드(ethylamide)에 의한 glycine-amide 치환 역시 GnRH 수용체와의 결합능을 더욱 높이는 것으로 알려져 있다(Sealfon et al., 1997). GnRHR에 대한 리간드 선택성에 관여하는 Tyr<sup>5</sup>, Leu<sup>7</sup>, Arg<sup>8</sup>(Lu et al., 2005), 특히 Leu<sup>7</sup>은 GnRH 유사체에서 치환되지 않는다. Leu<sup>7</sup>, Arg<sup>8</sup>은 GV1001에서 LA 및 CA와 중첩되는 residue에도 포함되어 있기 때문에, GV1001이 GnRH 수용체에 대한 강한 선택성을 가질 것으로 예측되었다. 이러한 결과를 토대로 GV1001이 GnRH 유사체와 같이 GnRH 수용체의 리간드로써 작동할 수 있는지 확인하였으며, 최초로 GV1001이 GnRH

수용체와 물리적인 결합을 갖는 것을 증명하였다. 또한, GV1001은 GnRH 수용체와 결합한 후, GnRH 수용체 하위의 신호 전달을 매개하는데 일반적인 GnRH 작용제에 의해 매개되는 주요 신호인 Gαq-칼슘 신호에 유의적인 증가가 관찰되지 않았으며, Gas-cAMP 신호에 대한 증폭 효과가 관찰되었다. 또한 GV1001과 LA를 병용 처치하였을 때, 서로 경쟁적으로 하위 신호를 억제하였는데, 이는 GV1001과 LA가 같은 GnRH 수용체를 경쟁적으로 공유하고 있다는 것을 보여준다. 기존 보고에서 GnRH 수용체 하위의 신호 전달이 수용체과 결합한 리간드의 농도에 의존적으로 변환이 일어난다고 제시한 바 있으며(Krsmanovic et al., 2003), 이를 바탕으로 본 연구 결과에서 보인 리간드 종류에 의존적인 하위 신호 변환에 대하여 수용체 결합능의 차이 때문이라고 해석할 수 있을 것이다. 실제로 LA는 내인성 GnRH와 비교하여 50 배 이상의 강한 결합능을 갖는 것으로 알려져 있으며, 다른 GnRH 유사체들도 서로 다른 아미노산의 치환을 통해 결합능의 큰 차이를 보인다(Schally et al., 1971; Schally et al., 2017).

일반적으로 GnRH 유사체를 투여하였을 때, 혈중 테스토스테론 수치의 증가가 투여 직후 관찰되며 이후 투여 전 수치보다 감소하는 양상이 관찰된다(Eckstein and Haas, 2014). 흥미롭게도 공개된 특허에서 GV1001을 투여하였을 시 랫드의 혈중 테스토스테론 수치 변화가 위와 유사하게 관찰되었으며, 혈중 황체형성호르몬(luteinizing hormone, LH) 수치 역시 GnRH 유사체와 같이 초기 시간의 증가와 이후 감소하는 양상이 관찰되었다(PCT application PCT/KR2014/005508). 이러한 결과를 종합하여 GV1001의 GnRH 수용체 리간드로서의 역할을 제시하고자 하였다.

GV1001이 GnRH 유사체와 같이 전립선암에 대한 항암 효능을 가지는지 평가하고자 하였다. LNCaP 전립선암 세포주를 누드마우스에 이식한 이종 이식 동물모델을 통해 GV1001의 전립선암의 성장에 대한 항암 효과를 평가하였다. GV1001의 투여는 LA 투여와 같이 전립선 종양의 성장을 억제하는 효과를 보였으며, 조직 내에서 세포 성장의 마커를 감소시키고 세포자가사멸의 마커를 증가시켰다. 또한, GV1001을 투여한 군에서 LA를 투여한 군과 다르게 암세포 전이의 마커인 MMP2, MMP9의 mRNA 수준이 현저하게 감소한 것을 관찰하였는데 앞서 밝힌 세포 내 서로 다른 G-단백질에 의한 신호 전달의 차이가 관여할 것으로 생각된다. 이러한 신호 전달의 차이가 세포 이동능 억제의 차이로 관찰되는지 확인하기 위해 transwell 이동능 평가를 수행하였고, GV1001 처리 시 LNCaP 세포의 이동능이 억제되는 것을 증명하였다. 또한, GV1001이 전립선암세포에서 세포막 및 세포질 내 존재한다는 사실을 면역형광염색법으로 보였으며, 이를 통해 GV1001의 세포 이동능 억제가 세포막에 발현된 GnRH 수용체를 직접 경유할 것으로 예측하였다. GV1001을 이용한 세포자가사멸 평가에서 GV1001은 GnRH 수용체 의존적으로 세포자가사멸을 유도하였으며, 이러한 효과는 GnRH 수용체가 발현된 LNCaP, PC-3 두 가지 전립선암 세포주에서 모두 관찰되었다. 이러한 결과들은 생체 내에서 GnRH 유사체들이 작동하는 시상하부의 수용체뿐만 아니라 암세포에 발현된 GnRH 수용체들 또한 암세포에 대한 직접적인 억제 효과를 가질 수 있음을 시사한다.

기존의 많은 연구에서 전립선암의 전이 및 저항성을 설명하기 위한 기전으로 안드로젠 자극이 없음에도 유도되는 AR 활성화나 (AR의

비정상적 과발현, AR 변이체, 돌연변이, AR-DNA 복합체 안정화, AR 전사 활성화 증가, 호르몬 생합성 증가 등), AR을 경유하지 않는 대체 신호의 활성화 등을 제시하고 있다(Galletti et al., 2017). 그러나 최근의 연구들을 통해 AR의 전립선암 이동능 및 전이의 억제 기능이 규명되며 AR 활성화와 함께 보조조절자의 역할이 전립선암 악성화의 새로운 치료법으로 주목받고 있다. AR과 결합하는 단백질은 1) 크로마틴-재편성 복합체(chromatin-remodelling complex) 구성, 2) 유비퀴틴-단백분해 신호 구성, 3) SUMO 전사후 조절 신호 구성, 4) splicing 이나 RNA 대사 조절, 5) DNA 보수 조절, 6) 샤페론, 7) 신호 전달 조절 및 그 밖의 다양한 역할을 수행하는 것으로 구분된다(Heemers and Tindall, 2007). 예를 들어, TIF2나 NKX3.1과 같은 보조조절자는 AR의 전사적 기능을 조절함으로써 각각 발암원성 및 저항성, 혹은 종양 억제에 관여하는 타겟 유전자를 증폭시키는 것으로 보고되어 있다(Feng et al., 2009; Lei et al., 2006). 본 연구에서 AR 활성화에 따른 전립선암 세포의 이동능 억제를 규명하였고, 그 과정에서 AR의 보조조절자가 관여하고 있을 것으로 생각하였다.

다음으로 실제 동물 실험과 세포 실험에서 관찰한 GV1001의 전립선암 억제효과와 GnRH 수용체 하위 전달 신호 중 Gas-cAMP 신호 특이적 활성화의 상관성을 평가하기 위해 전립선암 환자의 전이와 관련된 기 보고된 유전자 발현 분석을 진행하였고, Gas-cAMP 선택적 신호 전달인 hippo 신호 전달-YAP1을 도출하였다. Hippo 신호 전달은 정상적인 조직의 성장과 종양 억제를 관장하는 핵심 신호이며, 다양한 포유동물에서 공통적으로 발견된다(Shibata et al., 2018). Hippo 신호의 구성 효소인 MST1/2, SAV, LATS1/2 등은 전사 인자인 YAP과 TAZ를 인산화 시켜

세포질 내의 정체를 유도하고, 유비퀴틴화에 의한 단백질 분해를 유도한다. 그러나 인산화 되지 않은 YAP1은 핵 내에 축적되어 전사 인자로서 다양한 유전자들의 발현을 촉진한다. 암세포 내에서 YAP1은 성장, 형질 전환, 상피간엽전환, 항-세포자가사멸 및 항암제 저항성을 유도하는 유전자들의 발현을 촉진한다(Janse van Rensburg and Yang, 2016). 따라서 hippo 신호의 조절과 YAP1 활성화 조절은 암의 진행과 악성화에 중요한 치료 타겟이 되지만, 이를 조절하는 상위 신호는 물리적 결합인 세포외기질(extracellular matrix), 세포 극성, 세포간 상호 작용 등으로 매우 제한적으로 알려져 있다(Zhou et al., 2015). GPCR(G-단백질 연결수용체) 자극에 의해서는 하위의 G-단백질 중 Gas-선택적으로 hippo pathway는 활성화되며, 다른 G-단백질의 신호에 의해 반대로 불활성화된(Zhou et al., 2015). 전이와 상관성이 큰 보조조절자를 도출하기 위해 마이크로어레이데이터 분석을 통해 전립선암 진행에 따라 각각 증가, 감소하는 핵심 유전자로서 YAP1과 NKX3.1을 제시하였다. 실제로, YAP1 결핍은 전립선암 세포의 이동능 저하와 생체 내 전립선암 전이를 감소시켰다. GV1001 처치에 의해 YAP1의 인산화가 촉진되면, 세포질 내 축적과 유비퀴틴화가 진행되면서 AR과의 결합이 분리되었으며 이로 인한 세포 이동능이 저하되는 것을 증명하였다. 반대로 대표적인 종양 억제 유전자인 NKX3.1의 발현이 GV1001 처치에 의해 증가되었으며, AR과의 결합이 촉진되는 것을 관찰하였다. 이러한 현상과 GV1001 처치에 의해 AR 활성화가 동반된다는 결과는 AR 활성을 억제할 때에 세포 이동능이 증가한다는 보고와 함께 AR의 활성을 적절하게 증가시키는 것이 전립선암의 전이 억제에 중요할 것임을 뒷받침한다.



이를 바탕으로 GV1001의 Gas-cAMP 선택적 신호 전달에 hippo pathway와 YAP1 활성화 조절이 관여되어 있을것으로 생각하였고, 세포 실험을 통해 GV1001 처치에 의한 YAP1의 인산화, 세포질 내 축적 및 유비퀴틴화-단백분해효소 활성화를 관찰하였다. YAP1의 분해에 따라 AR과의 결합이 저해되고 YAP1 의존적 타겟 유전자의 발현이 억제되었다. 이러한 YAP1의 활성 억제 효과는 GV1001의 Gas-cAMP 신호 의존적으로 관찰되었다. 또한, GV1001 처치에 의해 AR의 인산화가 증가하였고 이러한 증가 역시 Gas-cAMP 신호 의존적으로 관찰되었다. 세포 전이 실험을 통해 GV1001의 Gas-cAMP 신호 의존적 YAP1 활성 억제가 세포 전이를 억제하고 있음을 확인하였고, 결과적으로 spleen-liver metastasis 동물 모델을 통해 GV1001 처치에 의해 암세포의 전이가 생체 내에서 억제됨을 관찰하였다.

결론적으로, GV1001은 신규 GnRH 수용체 작용제로써 생체 내에서 GnRH 수용체를 경유한 전립선암 억제 효과를 갖는다. 또한, 전립선암 세포에 발현된 GnRH 수용체를 직접 경유함으로써 Gas-cAMP 신호 선택적 활성화와 그로 인한 세포자가사멸 및 세포 내 전이신호 억제를 유도한다. Gas-cAMP 신호 선택적 활성화는 AR 인산화와 YAP1 인산화를 유도하여 YAP1의 저해가 동반되는 AR 활성화를 야기하고, 이는 결과적으로 전립선암 세포의 이동능과 생체 내 전이를 억제하였다. 이상의 결과들을 종합하여 GV1001이 전이성 전립선암의 치료에 효과적이고 안전성이 높은 새로운 약제가 될 수 있음을 제시한다.

## V. 참 고 문 헌

- AgoulNIK, I. U., and Weigel, N. L. (2009). Coactivator selective regulation of androgen receptor activity. *Steroids* 74, 669-674.
- Akaza, H. (2011). Combined androgen blockade for prostate cancer: review of efficacy, safety and cost-effectiveness. *Cancer science* 102, 51-56.
- Angelucci, C., Iacopino, F., Lama, G., Capucci, S., Zelano, G., Boca, M., Pistilli, A., and Sica, G. (2004). Apoptosis-related gene expression affected by a GnRH analogue without induction of programmed cell death in LNCaP cells. *Anticancer research* 24, 2729-2738.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., *et al.* (2014). YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158, 157-170.
- Bernhardt, S. L., Gjertsen, M. K., Trachsel, S., Moller, M., Eriksen, J. A., Meo, M., Buanes, T., and Gaudernack, G. (2006). Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. *British journal of cancer* 95, 1474-1482.
- Bono, A. V., Salvatore, M., and Celato, N. (2002). Gonadotropin-releasing hormone receptors in prostate tissue. *Analytical and quantitative cytology and histology* 24, 221-227.
- Borrioni, R., Di Blasio, A. M., Gaffuri, B., Santorsola, R., Busacca, M., Vigano, P., and Vignali, M. (2000). Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate. *Mol Cell*

Endocrinol 159, 37-43.

Boudadi, K., and Antonarakis, E. S. (2016). Resistance to Novel Antiandrogen Therapies in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Medicine Insights Oncology* 10, 1-9.

Brunsvig, P. F., Aamdal, S., Gjertsen, M. K., Kvalheim, G., Markowski-Grimsrud, C. J., Sve, I., Dyrhaug, M., Trachsel, S., Moller, M., Eriksen, J. A., and Gaudernack, G. (2006). Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 55, 1553-1564.

Brunsvig, P. F., Kyte, J. A., Kersten, C., Sundstrom, S., Moller, M., Nyakas, M., Hansen, G. L., Gaudernack, G., and Aamdal, S. (2011). Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6847-6857.

Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R. M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

Chi, K. N., Bjartell, A., Dearnaley, D., Saad, F., Schroder, F. H., Sternberg, C., Tombal, B., and Visakorpi, T. (2009). Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets. *European urology* 56, 594-605.

Chua, M. L., and Bristow, R. G. (2016). Testosterone in Androgen Receptor Signaling and DNA Repair: Enemy or Frenemy? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 3124-3126.

Clayton, R. N. (1988). Mechanism of GnRH action in gonadotrophs. *Human*

reproduction (Oxford, England) 3, 479-483.

Cleverly, K., and Wu, T. J. (2010). Is the metalloendopeptidase EC 3.4.24.15 (EP24.15), the enzyme that cleaves luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), an activating enzyme? *Reproduction* (Cambridge, England) 139, 319-330.

Conn, P. M., and Crowley, W. F., Jr. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual review of medicine* 45, 391-405.

Cornford, P., Bellmunt, J., Bolla, M., Briers, E., De Santis, M., Gross, T., Henry, A. M., Joniau, S., Lam, T. B., Mason, M. D., *et al.* (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European urology* 71, 630-642.

Crawford, E. D., Schellhammer, P. F., McLeod, D. G., Moul, J. W., Higano, C. S., Shore, N., Denis, L., Iversen, P., Eisenberger, M. A., and Labrie, F. (2018). Androgen Receptor Targeted Treatments of Prostate Cancer: 35 Years of Progress with Antiandrogens. *The Journal of urology* 200, 956-966.

Dai, Y., Jablons, D., and You, L. (2017). Hippo pathway in lung development. *Journal of thoracic disease* 9, 2246-2250.

Devlin, H. L., and Mudryj, M. (2009). Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. *Cancer letters* 274, 177-186.

Dondi, D., Moretti, R. M., Montagnani Marelli, M., Pratesi, G., Polizzi, D., Milani, M., Motta, M., and Limonta, P. (1998). Growth-inhibitory effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists on xenografts of the DU 145 human androgen-independent prostate cancer cell line in nude mice. *International journal of cancer* 76, 506-511.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M.,

Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., *et al.* (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183.

Eckstein, N., and Haas, B. (2014). Clinical pharmacology and regulatory consequences of GnRH analogues in prostate cancer. *European journal of clinical pharmacology* 70, 791-798.

Emons, G., Muller, V., Ortmann, O., and Schulz, K. D. (1998). Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 65, 199-206.

Enzo, E., Santinon, G., Pocaterra, A., Aragona, M., Bresolin, S., Forcato, M., Grifoni, D., Pession, A., Zanconato, F., Guzzo, G., *et al.* (2015). Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *The EMBO journal* 34, 1349-1370.

Feng, S., Tang, Q., Sun, M., Chun, J. Y., Evans, C. P., and Gao, A. C. (2009). Interleukin-6 increases prostate cancer cells resistance to bicalutamide via TIF2. *Molecular cancer therapeutics* 8, 665-671.

Galletti, G., Leach, B. I., Lam, L., and Tagawa, S. T. (2017). Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer treatment reviews* 57, 16-27.

Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S., and Wilson, E. M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer research* 61, 4315-4319.

Grosse, R., Schmid, A., Schoneberg, T., Herrlich, A., Muhn, P., Schultz, G., and Gudermann, T. (2000). Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *The Journal of biological chemistry* 275, 9193-9200.

Grundker, C., Volker, P., and Emons, G. (2001). Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142, 2369-2380.

Harris, W. P., Mostaghel, E. A., Nelson, P. S., and Montgomery, B. (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nature clinical practice Urology* 6, 76-85.

Hawes, B. E., Barnes, S., and Conn, P. M. (1993). Cholera toxin and pertussis toxin provoke differential effects on luteinizing hormone release, inositol phosphate production, and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor binding in the gonadotrope: evidence for multiple guanyl nucleotide binding proteins in GnRH action. *Endocrinology* 132, 2124-2130.

Heemers, H. V., and Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine reviews* 28, 778-808.

Hille, B., Tse, A., Tse, F. W., and Almers, W. (1994). Calcium oscillations and exocytosis in pituitary gonadotropes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 710, 261-270.

Hsu, P. C., You, B., Yang, Y. L., Zhang, W. Q., Wang, Y. C., Xu, Z., Dai, Y., Liu, S., Yang, C. T., Li, H., *et al.* (2016). YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 7, 51922-51933.

Imai, A., Horibe, S., Takagi, A., and Tamaya, T. (1997). Gi protein activation of gonadotropin-releasing hormone-mediated protein dephosphorylation in human endometrial carcinoma. *American journal of obstetrics and gynecology* 176, 371-

376.

Imai, A., Takagi, H., Horibe, S., Fuseya, T., and Tamaya, T. (1996). Coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to Gi protein in human reproductive tract tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, 3249-3253.

Jacobi, G. H., and Wenderoth, U. K. (1982). Gonadotropin-releasing hormone analogues for prostate cancer: untoward side effects of high-dose regimens acquire a therapeutical dimension. *European urology* 8, 129-134.

Janse van Rensburg, H. J., and Yang, X. (2016). The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cellular signalling* 28, 1761-1772.

Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 69-90.

Kakar, S. S., Grizzle, W. E., and Neill, J. D. (1994). The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 106, 145-149.

Kang, S. K., Choi, K. C., Yang, H. S., and Leung, P. C. (2003). Potential role of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II in the ovary and ovarian cancer. *Endocrine-related cancer* 10, 169-177.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, NY)* 266, 2011-2015.

Kirby, M., Hirst, C., and Crawford, E. D. (2011). Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International journal of clinical practice* 65, 1180-1192.

Kraus, S., Levy, G., Hanoach, T., Naor, Z., and Seger, R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone induces apoptosis of prostate cancer cells: role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase, protein kinase B, and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Cancer research* *64*, 5736-5744.

Kraus, S., Naor, Z., and Seger, R. (2006). Gonadotropin-releasing hormone in apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer letters* *234*, 109-123.

Krsmanovic, L. Z., Mores, N., Navarro, C. E., Arora, K. K., and Catt, K. J. (2003). An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 2969-2974.

Kyte, J. A. (2009). Cancer vaccination with telomerase peptide GV1001. *Expert Opin Investig Drugs* *18*, 687-694.

Kyte, J. A., Gaudernack, G., Dueland, S., Trachsel, S., Julsrud, L., and Aamdal, S. (2011). Telomerase peptide vaccination combined with temozolomide: a clinical trial in stage IV melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *17*, 4568-4580.

Lasdun, A., Reznik, S., Molineaux, C. J., and Orlowski, M. (1989). Inhibition of endopeptidase 24.15 slows the in vivo degradation of luteinizing hormone-releasing hormone. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *251*, 439-447.

Lassi, K., and Dawson, N. A. (2010). Update on castrate-resistant prostate cancer: 2010. *Current opinion in oncology* *22*, 263-267.

Lee, J. E., Park, H. S., Lee, D., Yoo, G., Kim, T., Jeon, H., Yeo, M. K., Lee, C. S., Moon, J. Y., Jung, S. S., *et al.* (2016). Hippo pathway effector YAP inhibition restores the sensitivity of EGFR-TKI in lung adenocarcinoma having primary or acquired



EGFR-TKI resistance. *Biochemical and biophysical research communications* 474, 154-160.

Lee, K. W., Lee, S. S., Kim, S. B., Sohn, B. H., Lee, H. S., Jang, H. J., Park, Y. Y., Kopetz, S., Kim, S. S., Oh, S. C., and Lee, J. S. (2015). Significant association of oncogene YAP1 with poor prognosis and cetuximab resistance in colorectal cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 357-364.

Lei, Q., Jiao, J., Xin, L., Chang, C. J., Wang, S., Gao, J., Gleave, M. E., Witte, O. N., Liu, X., and Wu, H. (2006). NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer cell* 9, 367-378.

Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J., and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *The EMBO journal* 19, 4342-4350.

Limonta, P., Moretti, R. M., Marelli, M. M., Dondi, D., Parenti, M., and Motta, M. (1999). The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* 140, 5250-5256.

Ling, H. H., Kuo, C. C., Lin, B. X., Huang, Y. H., and Lin, C. W. (2017). Elevation of YAP promotes the epithelial-mesenchymal transition and tumor aggressiveness in colorectal cancer. *Experimental cell research* 350, 218-225.

Lonergan, P. E., and Tindall, D. J. (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis* 10, 20.

Lu, Z. L., Gallagher, R., Sellar, R., Coetsee, M., and Millar, R. P. (2005). Mutations remote from the human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor-binding

sites specifically increase binding affinity for GnRH II but not GnRH I: evidence for ligand-selective, receptor-active conformations. *The Journal of biological chemistry* 280, 29796-29803.

Magee, J. A., Abdulkadir, S. A., and Milbrandt, J. (2003). Haploinsufficiency at the Nkx3.1 locus. A paradigm for stochastic, dosage-sensitive gene regulation during tumor initiation. *Cancer cell* 3, 273-283.

Maudsley, S., Davidson, L., Pawson, A. J., Chan, R., Lopez de Maturana, R., and Millar, R. P. (2004). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonists promote proapoptotic signaling in peripheral reproductive tumor cells by activating a G $\alpha$ q-coupling state of the type I GnRH receptor. *Cancer research* 64, 7533-7544.

Millar, R. P., Lu, Z. L., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., and Maudsley, S. R. (2004). Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine reviews* 25, 235-275.

Mo, J. S., Park, H. W., and Guan, K. L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports* 15, 642-656.

Mottet, N., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M., Matveev, V., Schmid, H. P., Van der Kwast, T., Wiegel, T., Zattoni, F., and Heidenreich, A. (2011). EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *European urology* 59, 572-583.

Naor, Z., and Huhtaniemi, I. (2013). Interactions of the GnRH receptor with heterotrimeric G proteins. *Frontiers in neuroendocrinology* 34, 88-94.

Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental cell* 19, 491-505.

Peter, A., Devadder, S., Laus, G., and Tourwe, D. (1996). Liquid chromatography

studies on the enzymatic degradation of luteinizing hormone-releasing hormone analogues with off-line identification by mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 729, 137-142.

Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M., Matsuo, H., Redding, T. W., and Debeljuk, L. (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and biophysical research communications* 43, 393-399.

Schally, A. V., Block, N. L., and Rick, F. G. (2017). Discovery of LHRH and development of LHRH analogs for prostate cancer treatment. *The Prostate* 77, 1036-1054.

Sealfon, S. C., Weinstein, H., and Millar, R. P. (1997). Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrine reviews* 18, 180-205.

Shibata, M., Ham, K., and Hoque, M. O. (2018). A time for YAP1: Tumorigenesis, immunosuppression and targeted therapy. *International journal of cancer* 143, 2133-2144.

Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., and Jemal, A. (2011). Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 61, 212-236.

Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., Manfrin, A., Ingallina, E., Sommaggio, R., Piazza, S., *et al.* (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature cell biology* 16, 357-366.

Stanislaus, D., Ponder, S., Ji, T. H., and Conn, P. M. (1998). Gonadotropin-releasing hormone receptor couples to multiple G proteins in rat gonadotrophs and in GH3

cells: evidence from palmitoylation and overexpression of G proteins. *Biology of reproduction* 59, 579-586.

Sun, D., Li, X., He, Y., Li, W., Wang, Y., Wang, H., Jiang, S., and Xin, Y. (2016). YAP1 enhances cell proliferation, migration, and invasion of gastric cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget* 7, 81062-81076.

Tan, P. Y., Chang, C. W., Chng, K. R., Wansa, K. D., Sung, W. K., and Cheung, E. (2012). Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Molecular and cellular biology* 32, 399-414.

Voliotis, M., Garner, K. L., Alobaid, H., Tsaneva-Atanasova, K., and McArdle, C. A. (2018). Gonadotropin-releasing hormone signaling: An information theoretic approach. *Mol Cell Endocrinol* 463, 106-115.

Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K. D., Walker, D., Yu, H., Halili, M. V., Hu, Y. P., Price, S. M., Abate-Shen, C., and Shen, M. M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature* 461, 495-500.

White, C. D., Stewart, A. J., Lu, Z. L., Millar, R. P., and Morgan, K. (2008). Antiproliferative effects of GnRH agonists: prospects and problems for cancer therapy. *Neuroendocrinology* 88, 67-79.

Yang, X., Rojanasakul, Y., Wang, L., Ma, J. Y., and Ma, J. K. (1998). Enzymatic degradation of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)/[D-Ala6]-LHRH in lung pneumocytes. *Pharmaceutical research* 15, 1480-1484.

Yu, M., Chen, Y., Li, X., Yang, R., Zhang, L., Huangfu, L., Zheng, N., Zhao, X., Lv, L., Hong, Y., *et al.* (2018). YAP1 contributes to NSCLC invasion and migration by promoting Slug transcription via the transcription co-factor TEAD. *Cell death & disease* 9, 464.

- Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer cell* 29, 783-803.
- Zhang, H., Muders, M. H., Li, J., Rinaldo, F., Tindall, D. J., and Datta, K. (2008). Loss of NKX3.1 favors vascular endothelial growth factor-C expression in prostate cancer. *Cancer research* 68, 8770-8778.
- Zhao, B., Lei, Q. Y., and Guan, K. L. (2008). The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Current opinion in cell biology* 20, 638-646.
- Zhou, X., Wang, Z., Huang, W., and Lei, Q. Y. (2015). G protein-coupled receptors: bridging the gap from the extracellular signals to the Hippo pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47, 10-15.

## **VI. Abstract**

### **Anti-prostate cancer effect of GV1001, a novel GnRHR ligand**

Ji Won Kim

Advisor: Prof. Keon Wook Kang

GV1001, a 16-amino acid fragment of the human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit (hTERT), has been developed as an injectable formulation of cancer vaccine. Here, we revealed for the first time that GV1001 is a novel ligand for gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR). Binding of GV1001 to GnRHR stimulated the G $\alpha$ s-coupled cAMP signaling pathway and antagonized G $\alpha$ q-coupled Ca<sup>2+</sup> release by leuprolide acetate (LA), a GnRHR agonist. We then tested whether GV1001 has an inhibitory effect on tumor growth of LNCaP cells, androgen receptor-positive human prostate cancer (PCa) cells. GV1001 significantly inhibited tumor growth and induced apoptosis in LNCaP-implanted xenografts. Interestingly, mRNA expression of matrix metalloproteinase2 and matrix metalloproteinase9 was

suppressed by GV1001, but not by LA. Moreover, GV1001 inhibited the proliferation and migration of PCa cells and induced GnRHR-dependent apoptosis. Inhibition of androgen receptor (AR) activity or androgen deficiency is known to cause resistance of prostate cancer to anti-androgen agents. GV1001 treatment increased both cAMP/PKA-dependent AR phosphorylation and androgen-response element (ARE)-mediated transcriptional activity in LNCaP cells. The enhanced AR activation by GV1001 suppressed the cell migration ability of LNCaP cells. Although AR activity is generally considered as a major mediator of PCa growth, interaction of AR with specific coregulators can determine the fate of PCa progression such as metastasis and chemoresistance. Among diverse AR coregulators, Gene Expression Omnibus (GEO) analyses showed that YAP1 was identified as a key gene for metastasis of prostate cancer. cAMP/PKA-dependent Ser-127 phosphorylation and the subsequent ubiquitination of YAP1 were enhanced by GV1001 in LNCaP cells. Moreover, GV1001-induced YAP1 degradation inhibited its binding to AR and consequently suppressed the expression of downstream target genes of YAP1. Inhibitory effect of cell migration by GV1001 was completely reversed by overexpression of YAP5SA, constitutive active form of YAP1. Spleen-liver metastasis mouse model confirmed that liver metastasis of PCa

cells implanted in spleen was significantly inhibited by GV1001 injection. Taken together, our data reveal that GV1001 is a novel ligand of GnRHR and shows anti-cancer efficacy in PCa.

Keywords: prostate cancer, hTERT, GV1001, androgen receptor, coregulators, hippo pathway, YAP1, NKX3.1, proliferation, migration, cancer metastasis

Student ID Number: 2012-21577



## VII. *Curriculum Vitae*

**NAME** : Ji Won Kim  
**DATE OF BIRTH** : June 19, 1989  
**ADDRESS** : 29-309, College of Pharmacy, Seoul National University  
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Korea, 151-742  
Tel: +822-880-7855  
Cellular Phone: +82-10-4584-7976  
E-mail: kim89jw@snu.ac.kr

### EDUCATION

◆ **Seoul National University**, Seoul, Republic of Korea 2012-present

**Ph.D. Candidate in Pharmacy**

Concentration: Molecular Pharmacology

Thesis: Anti-prostate cancer effect of GV1001, a novel

GnRHR ligand

Advisor: Professor Dr. Keon Wook Kang

◆ **Chosun University**, Seoul, Republic of Korea 2008-2012

**B.S. in Pharmacy**

### PROFESSIONAL LICENSE

◆ **Registered Pharmacist (Republic of Korea)** 2012-present

## **AWARDS AND HONORS**

1. Feb. 28, 2018: Award for great paper, PharmNet, Seoul National University.
2. Nov. 16, 2017: Award for best poster presentation (Elsevier Award), ICEM-ACEM The 12<sup>th</sup> international conference & 5<sup>th</sup> Asian congress on environmental mutagens.
3. Jun. 26, 2015: Award for excellent poster presentation, The 7<sup>th</sup> international congress of Asian society of toxicology.

## **PUBLICATIONS**

1. Yang JW, Kim HS, Im JH, Kim JW, Jun DW, Lim SC, Lee K, Choi JM, Kim SK, Kang KW (2016). GPR119: a promising target for nonalcoholic fatty liver disease. *FASEB J*, 30(1):324-35.
2. Thuy Phuong NT\*, Kim JW\* Kim JA, Jeon JS, Lee JY, Xu WJ, Yang JW, Kim SK, Kang KW (2017). Role of the CYP3A4-mediated 11,12-epoxyeicosatrienoic acid pathway in the development of tamoxifen-resistant breast cancer. *Oncotarget*, 18;8(41):71054-71069.

\*These authors have contributed equally to this work

3. Kim JW, Yadav DK, Kim SJ, Lee MY, Park JM, Kim BS, Kim MH, Park HG, Kang KW (2019). Anti-cancer effect of GV1001 for prostate cancer; function as a ligand of GnRHR. *Endocr Relat Cancer*, 26(2): 147-162 (accepted: 2018. Oct)
4. Kim JW, Gautam JY, Kim JE, Kim JA, Kang KW (2019). Inhibition of tumor growth and angiogenesis of tamoxifen-resistant breast cancer cells by ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor. *Oncology letters* (accepted: 2019. Jan)

## **PRESENTATION (POSTER)**

1. Ji Won Kim, Hyo Seon Kim, and Keon Wook Kang. Anti-cancer effects of

ruxolitinib, a selective JAK2 inhibitor; on tamoxifen-resistant breast cancer. 2018 Fall International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea. Oct. 17-19, 2018.

2. Ji Won Kim, and Keon Wook Kang. Involvement of Cyp3a4-Mediated 11,12-epoxyeicosatrienoic Acid in the Tumorigenic Potential of Tamoxifen-Resistant Breast Cancer. The 12<sup>th</sup> International Conference & 5<sup>th</sup> Asian Congress on Environmental Mutagens. Nov. 12-16, 2017.

3. Ji Won Kim, Moo Yeol Lee, and Keon Wook Kang. The Effects Of Novel Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (GnRHR) Ligand, GV-1001, as Anti-Prostate Cancer Agent. Korean Society of Toxicology & Asian Society of Toxicology. Jun. 24-26, 2015.

#### **PRESENTATION (ORAL)**

1. Ji Won Kim, and Keon Wook Kang. Studies on the inhibitory effects of a novel GnRHR ligand on prostate cancer and its mechanism. The 70<sup>th</sup> Korean Society of Pharmacology 2018 Fall Conference, Nov. 1-2, 2018.

2. Kim JW, and Kang KW. Identification of a novel GnRHR ligand and its inhibitory effects on prostate cancer. Pharmacology Section of the Pharmaceutical Society of Korea Summer Symposium, Jun. 25-26, 2018.

3. Kim Ji Won, Role of the CYP3A4-mediated 11,12-epoxyeicosatrienoic acid pathway in the development of tamoxifen-resistant breast cancer. Pharmnet of the Seoul National University, Feb. 28, 2018

4. Ji Won Kim, Moo Yeol Lee, and Keon Wook Kang. Anti-prostate cancer effect of GV-1001, a novel gonadotropin-releasing hormone receptor ligand. ICCST 2015: International Conference on Cancer Science and Therapy, Feb. 26-27, 2015.